

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANA PAULA PITARELO

**PRODUÇÃO DE ETANOL CELULÓSICO A PARTIR DO BAGAÇO DE CANA
PRÉ-TRATADO POR EXPLOSÃO A VAPOR**

**CURITIBA
2013**

ANA PAULA PITARELO

***PRODUÇÃO DE ETANOL CELULÓSICO A PARTIR DO BAGAÇO DE CANA
PRÉ-TRATADO POR EXPLOSÃO A VAPOR***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Química, Sub-Área de Química Orgânica.

Orientador: Dr. Luiz Pereira Ramos

**CURITIBA
2013**

AGRADECIMENTOS

É muito bom dizer *OBRIGADA* a tantas pessoas que, nestes 4 anos, estiveram ao meu lado. Por isso meus sinceros agradecimentos ...

... à Deus por todas as pessoas que passaram pela minha vida durante essa caminhada e por me guiar e me iluminar nos momentos difíceis.

... aos meus pais, Paulo e Marta, pelo imenso amor, constante incentivo, enorme compreensão, infinita sabedoria e paciência, amo vocês!

...aos meus irmãos maravilhosos, Claudia, Débora, Paulo e Rafael, e aos meus sobrinhos Gabriela, Nicolas, Wallace, Elena e Sofia, por serem meu porto seguro e fonte estímulo, onde muitas vezes recarreguei minhas forças, amo vocês!

... ao meu orientador, Luiz Pereira Ramos, pela orientação, profissionalismo, ensinamentos, apoio, confiança, dedicação, paciência e amizade ao longo destes oito anos de convivência, eterno exemplo.

... ao Laboratório Nacional de Energia e Geologia, em especial, ao Dr. César Fonseca, à Dra. Luisa Bevilar, à Dra. Susana Marques e aos alunos de doutorado, Carla Ferreira, Nuno Faria, Raquel Cadete e Carla Lara, por compartilhar seus conhecimentos e experiências e pela amizade durante minha estadia em Lisboa.

... aos colegas de laboratório, em especial, à Danielle Szczerbowski, ao Arion (gordo), ao Marcos Silveira, ao Rodrigo Aguiar, ao Michael Padro, ao Marcos Brandalize, ao Marcos Melo, ao Rafael Marangoni, à Wiviane Gomes, apoio nos experimentos de explosão a vapor, amizade e companheirismo durante o desenvolvimento deste trabalho.

... à Novozymes Latin América (Araucária, PR), pelo fornecimento das preparações enzimáticas comerciais utilizadas neste trabalho.

... a todos os amigos e colegas do Departamento de Química da UFPR, em especial, ao grupo das "*Lyndas, phynas e rycas*", pela amizade e pelos momentos de descontração.

... aos amigos que não poderia esquecer de citar, Daiane, Agne, Danielle, Diogo, Rafael (Janjão), Ana Cristina (Bauru), Emir, Juliana, Andréia, Aline, Fran, Janaína, Paula, Patrícia, Érica, Dayane, pelo apoio, amizade, carinho e estímulo nos momentos de dificuldades. Amigos para toda a hora.

... à Capes pela concessão da bolsa.

... à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Química da UFPR, pela a oportunidade concedida.

... a todas as pessoas que, de maneira direta ou indireta, fizeram parte integrante deste processo, *MUITO OBRIGADA!*

“Não há transição que não implique um ponto de partida, um processo e um ponto de chegada. Toda amanhã se cria num ontem, através de um hoje. De modo que o nosso futuro baseia-se no passado e se corporifica no presente. Temos de saber o que fomos e o que somos, para sabermos o que seremos.”

Paulo Freire

RESUMO

A explosão a vapor do bagaço de cana-de-açúcar foi realizada na ausência (auto-hidrólise) e na presença de ácido fosfórico como catalisador com o objetivo de avaliar os efeitos da temperatura (180 e 210°C), da concentração de ácido fosfórico (0 e 19 mg.g⁻¹ de bagaço seco) e do tempo de permanência no reator (5 e 10 min) sobre a estrutura e a reatividade do material lignocelulósico. Os resultados revelaram que, para os experimentos de autohidrólise, o aumento da drasticidade do pré-tratamento (210°C por 10 min) aumentou a solubilização das hemiceluloses e a acessibilidade da celulose à hidrólise enzimática, ao passo que, para os experimentos de catálise fosfórica, resultados equivalentes foram obtidos em condições mais suaves de pré-tratamento (180°C por 5 min). A partir dos resultados de recuperação de anidroglicose após o pré-tratamento e de conversão de celulose em glicose via hidrólise enzimática, os substratos escolhidos para serem testados na etapa de fermentação foram correspondentes aos experimentos B08 (180°C por 5 min com 19 mg H₃PO₄.g⁻¹ de bagaço seco), B16 (7,5 min, 195 °C) e ao ponto central do planejamento (195°C por 7,5 min com 9,5 mg H₃PO₄.g⁻¹ de bagaço seco), que proporcionaram rendimentos totais de sacarificação de 77,93; 80,58 e 68.27±0,66 %, respectivamente, após 96 h de hidrólise a 8% com 30 mg de enzima.g⁻¹ de substrato (Cellic CTec 2, Novozymes). A produção de etanol celulósico foi realizada pelos processos sacarificação e fermentação em separado (*SHF*) e sacarificação e fermentação simultâneas (*SSF*) a partir dos substratos produzidos por autohidrólise e por catálise fosfórica. Os maiores rendimentos de fermentação foram obtidos para o substrato autohidrolisado (195°C, 7,5 min) previamente lavado com água (BEV-IA), que produziu 25,02 g.L⁻¹ (*SHF*) e 21,68 g.L⁻¹ (*SSF*) de etanol a partir de seu componente celulósico. Já para o ponto central do planejamento, a produção média foi de 23,5±0,96 g.L⁻¹ para *SHF* e 17,62±0,96 g.L⁻¹ para *SSF*. Por outro lado, os ensaios de *SHF* e *SSF* obtidos para os substratos não lavados com água (BEV-SL) foram muito inferiores aos experimentos realizados com os substratos lavados (BEV-IA). Estes resultados mostraram que altos rendimentos de fermentação são obtidos quando o material pré-tratado é submetido a uma etapa de lavagem para a remoção dos compostos solúveis gerados durante o pré-tratamento. Além disto, foi demonstrado que o furfural é um dos principais inibidores dos microrganismos utilizados na fermentação. As modificações químicas que ocorreram no bagaço de cana após a explosão a vapor foram avaliadas em relação ao bagaço *in natura*, sendo que as condições de pré-tratamento empregadas neste estudo foram escolhidas a partir da modelagem matemática realizada para estimar o percentual de recuperação de anidroglicose e a produção de furfural em relação às principais variáveis empregadas no processo. Tais condições corresponderam aos experimentos realizados a 180°C por 5 e 10 min usando 9,5 mg H₃PO₄.g⁻¹ de bagaço (massa seca) (experimentos B18 e B19, respectivamente). A caracterização química dos substratos pré-tratados, em comparação com o material *in natura*, revelou que o pré-tratamento diminuiu o grau de polimerização da celulose em 40% e produziu um substrato com maior índice de cristalinidade, provavelmente devido à remoção parcial das hemiceluloses e da lignina. Já a massa molar aparente da lignina pré-tratada não foi alterada significativamente em relação à lignina do bagaço *in natura*, apesar dos efeitos de sua hidrólise ácida parcial em compostos aromáticos hidrossolúveis. Tal contradição foi atribuída à prevalência de reações de hidrólise sobre as de condensação, que ocorrem preferencialmente sob condições mais drásticas de pré-tratamento. Com base nos dados de fermentação obtidos neste trabalho, foi comprovado que a produção de etanol por tonelada de cana processada poderá aumentar de 80 para 111 litros com o aproveitamento dos açúcares fermentescíveis oriundos da hidrólise enzimática da celulose presente no bagaço de cana.

Palavras-chave: bagaço de cana, caracterização química, explosão a vapor, hidrólise enzimática e etanol celulósico.

ABSTRACT

The steam explosion of sugarcane bagasse was carried out in the absence (autohydrolysis) and in the presence of phosphoric acid as the pretreatment catalyst, with the objective of evaluating the effects of temperature (180 and 210 °C), phosphoric acid concentration (0 and 19 mg.g⁻¹ of dry substrate) and pretreatment time (5 and 10 min) on the structure and reactivity of the lignocellulosic material. Autohydrolysis at the most drastic pretreatment conditions (210°C, 10 min) increased hemicellulose removal and cellulose accessibility to enzymatic hydrolysis but milder conditions (180°C, 5 min) were also successful when phosphoric acid was used as an acid catalyst. The best conditions were defined as those in which high anhydroglucose yields were obtained after pretreatment and enzymatic hydrolysis. The best substrates were derived from experiments B08 (180°C, 5 min, 19 mg H₃PO₄.g⁻¹ of dry substrate) and B16 (195°C, 7.5 min), as well as from the center point of the experimental design (195°C, 7.5 min, 9.5 mg H₃PO₄.g⁻¹ of dry substrate). Hydrolysis for 96 h using 8 wt% of substrate (dry basis) and 30 mg enzyme.g⁻¹ of substrate (Cellic CTec 2, Novozymes) provided total enzymatic hydrolysis yields of 77.93, 80.58 and 66.27±0.66% from these substrates, respectively. The production of cellulosic ethanol was performed by both separate hydrolysis and fermentation (SHF) and simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of pretreated substrates derived from autohydrolysis (B16) and phosphoric acid catalysis (center point) using industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae*. The best yields were obtained from water-washed substrates (BEV-IA) derived from autohydrolysis, which were able to produce 25.02 g.L⁻¹ and 21.68 g.L⁻¹ of ethanol from its cellulosic component by SHF and SSF, respectively. Alternatively, at the center point of the experimental design, the average ethanol production was 23.5±0.96 g.L⁻¹ for SHF and 17.62±0.96 g.L⁻¹ for SSF. However, when both SHF and SSF experiments were carried out with unwashed substrates (BEV-SL), that is, without the use of water washing after pretreatment, much lower ethanol yields were obtained in relation to the experiments carried out with water-washed substrates (BEV-IA). These results showed that high yields of fermentation are only obtained when the pretreated material is submitted to a pre-washing stage to remove water-soluble inhibitory components that are generated during pretreatment. Under the conditions used in this study, furfural was the most important inhibitor for the fermentation microorganisms, meaning that other inhibitory compounds such as phenolic acid and acetic acid were not produced in concentrations high enough to compromise hydrolysis and fermentation. The chemical modifications that occurred in cane bagasse after steam explosion were also evaluated and compared to the chemical composition of the untreated material. The conditions used for this purpose from a mathematical modeling of the pretreatment data, having its total anhydroglucose yield as the main response surface, along with the total release of furfural in the water-soluble fraction. The best conditions revealed by this model were those in which bagasse was pretreated at 180 °C for 5 or 10 min using 9.5 mg H₃PO₄.g⁻¹ of dry substrate (experiments B18 and B19, respectively). The chemical characterization of the pretreated substrates revealed that pretreatment decreased the cellulose degree of polymerization in 40% and produced a substrate with high crystallinity index, probably due to the partial removal of hemicelluloses and lignin. However, the molar mass of pretreated lignin was not significantly altered in relation to lignin of the untreated bagasse, despite of its partial acid hydrolysis in water-soluble aromatic compounds. This suggests that acid hydrolysis prevailed over condensation reactions that occur preferably under more drastic pretreatment conditions. Based on the fermentation yields obtained in this study, it seems that the total ethanol production per ton of sugarcane could be increased from 80 to 111 liters if the glucose provenient from the enzymatic hydrolysis of cane bagasse were added to the already existing sucrose fermentation.

Keywords: sugarcane bagasse, chemical characterization, steam explosion, enzymatic hydrolysis and cellulosic ethanol.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	REPRESENTAÇÃO DA CADEIA LINEAR DA CELULOSE, FORMADA POR VÁRIAS UNIDADES CONSECUTIVAS DE CELOBIOSE (TÍMÁR-BALÁZSY E EASTOP, 1998).....	17
FIGURA 2	MONOSSACARÍDEOS CONSTITUINTES DAS HEMICELULOSES. D-GLUCOSE (1), D-GALACTOSE (2), L-ARABINOSE (3), D-XILOSE (4), D-MANOSE (5), 4-O-METIL-D-GLUCURÔNICO (6) E L-RAMNOSE (7) (SJÖSTRÖM, 1999).....	19
FIGURA 3	ESTRUTURA DOS ÁLCOOIS PRECURSORES DA LIGNINA (SJÖSTRÖM, 1992).....	20
FIGURA 4	ESTRUTURA MACROMOLECULAR DA LIGNINA E REPRESENTAÇÃO DAS LIGAÇÕES ENTRE: (1) CARBONO-CARBONO DE CADEIAS ALIFÁTICAS; (2) CADEIAS ALIFÁTICAS E ANÉIS AROMÁTICOS; (3) CARBONOS AROMÁTICOS E (4) CADEIAS ALIFÁTICAS E ANÉIS AROMÁTICOS.....	21
FIGURA 5	DIGRAMA GLOBAL DE PRODUÇÃO DE BIOETANOL A PARTIR DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA (PITARELO <i>et al.</i> , 2010).....	23
FIGURA 6	MODIFICAÇÕES QUÍMICAS QUE OCORRE NAS HEMICELULOSES (4-O-METIL-GLUCURONOXILANA) E NA CELULOSE APÓS AO PRÉ-TRATAMENTO POR EXPLOSÃO A VAPOR (RAMOS, 2003).....	30
FIGURA 7	MECANISMO DE DESIDRATAÇÃO DE PENTOSES (R = H) E HEXOSES (R = CH ₂ OH) EM MEIO ÁCIDO, FORMANDO FURFURAL E HIDROXIMETILFURFURAL.....	31
FIGURA 8	COMPOSTOS FENÓLICOS DECORRENTES DA DEGRADAÇÃO DA LIGNINA APÓS AO PRÉ-TRATAMENTO POR EXPLOSÃO A VAPOR DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS.....	32
FIGURA 9	MODO DE AÇÃO DO COMPLEXO CELULÁSICO DE <i>T. reesei</i> (RAMOS <i>et al.</i> , 2004).....	35
FIGURA 10	MECANISMO SIMPLIFICADO DA HIDRÓLISE DAS LIGAÇÕES GLICOSÍDICAS DO TIPO β -(1→4): (A) INVERSÃO DE CONFIGURAÇÃO E (B) RETENÇÃO DE CONFIGURAÇÃO (MELO e CARVALHO, 2006).....	37
FIGURA 11	TECNOLOGIA DESENVOLVIDA PELA PROESA TM PARA PRODUÇÃO DE ETANOL CELULÓSICO E OUTROS PRODUTOS QUÍMICOS A PARTIR DE BIOMASSA.....	50

FIGURA 12	FLUXOGRAMA DAS ETAPAS DESENVOLVIDAS NESTE TRABALHO.....	53
FIGURA 13	INSTALAÇÕES DO REATOR DE EXPLOÇÃO A VAPOR, LOCALIZADO NO NÚCLEO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE ENERGIA AUTOSSUSTENTÁVEL (NPDEAS) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ.....	64
FIGURA 14	ESPECTROS DE FTIR DOS EXTRAÍVEIS DO BAGAÇO DE CANA EM ETÉR ETÍLICO (EE), DICLOROMETANO (DCM), ETANOL:TOLUENO (ET), ETANOL (EtOH) E ÁGUA.....	72
FIGURA 15	PERFIL DE DRX DO BAGAÇO DE CANA <i>IN NATURA</i> COM (BIN) E SEM EXTRAÍVEIS (BINE) E DA SUA HOLOCELULOSE E α -CELULOSE.....	83
FIGURA 16	PERFIL DE DRX DA HEMICELULOSE A E B DO BAGAÇO DE CANA....	83
FIGURA 17	ESPECTROS DE FTIR DA LIGNINA APÓS A EXTRAÇÃO COM DIOXANO:HCl _{aq}	86
FIGURA 18	ESPECTRO DE RMN DE ¹ H PARA LIGNINA DIOXANO ACETILADA DO BAGAÇO DE CANA.....	88
FIGURA 19	ESPECTRO DE RMN DE ¹³ C PARA LIGNINA DIOXANO DO BAGAÇO DE CANA.....	89
FIGURA 20	PERFIL CROMATOGRÁFICO DERIVADOS DOS EXPERIMENTOS DE (A) AUTOHIDRÓLISE (B16) E (B) CATALISADOS POR ÁCIDO FOSFÓRICO (B07) ANTES E DEPOIS DA PÓS-HIDRÓLISE (PH), OBTIDO COM DETECTORE DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO (RID).....	94
FIGURA 21	EFEITOS ESTATÍSTICOS PARA O RENDIMENTO DE RECUPERAÇÃO DA CELULOSE DURANTE O PRÉ-TRATAMENTO (GRÁFICO DE PARETO).....	100
FIGURA 22	GRÁFICOS DE CONTORNO OBTIDOS PARA A RECUPERAÇÃO DE ANIDROGLUCOSE (CELULOSE) EM RELAÇÃO AS VARIÁVEIS EMPREGADAS NO PLANEJAMENTO FATORIAL.....	102
FIGURA 23	EFEITOS ESTATÍSTICOS PARA A PRODUÇÃO DE FURFURAL DURANTE O PRÉ-TRATAMENTO (GRÁFICO DE PARETO).....	103
FIGURA 24	GRÁFICOS DE CONTORNO OBTIDOS PARA A CONCENTRAÇÃO DE FURFURAL EM RELAÇÃO AS VARIÁVEIS EMPREGADAS NO PLANEJAMENTO FATORIAL.....	106
FIGURA 25	ELETROFEROGRAMA TÍPICO DE UMA AMOSTRA DE BEV-AS EM 200 nm, CONTENDO (1) SIRINGALDEÍDO, (2) VANILINA, (4) ÁCIDO FERÚLICO, (5) <i>p</i> -HIDROXIBENZALDEÍDO, (6) ÁCIDO <i>p</i> -CUMÁRICO E	

	(7) ÁCIDO VANÍLICO, ONDE *d1 E *d2 CORRESPONDEM A COMPOSTOS NÃO IDENTIFICADOS.....	109
FIGURA 26	OXIDAÇÃO DOS MONOLIGNÓIS PRESENTES NA CADEIA DE BIOSSÍNTESE DA LIGNINA.....	109
FIGURA 27	CONSUMO DE GLUCOSE E PRODUÇÃO DE ETANOL OBTIDO NO EXPERIMENTO DE <i>SHF</i> PARA OS HIDRÓLISADOS ENZIMÁTICOS DO BAGAÇO DE CANA PRÉ-TRATADO POR EXPLOSÃO A VAPOR.....	117
FIGURA 28	CONCENTRAÇÃO DE GLUCOSE E PRODUÇÃO DE ETANOL OBTIDOS NOS EXPERIMENTOS DE <i>SSF</i> PARA LEVEDURA PYCC4072 DE <i>S. cerevisiae</i>	120
FIGURA 29	TAXA DE CRESCIMENTO PARA AS LEVEDURAS PYCC 4072 E THERMOSSAC DRY® DE <i>S. cerevisiae</i> . (A) 8 g.L ⁻¹ DE FURFURAL; (B) e (C) 4 g.L ⁻¹ DE FURFURAL (D) 2 g.L ⁻¹ DE FURFURAL.....	125
FIGURA 30	DIFRATOGRAMA DE RAIOS X DO BAGAÇO <i>IN NATURA</i> COM E SEM EXTRAÍVEIS, DO MATERIAL PRÉ-TRATADO POR EXPLOSÃO A VAPOR E DA HOLOCELULOSE.....	132
FIGURA 31	ESPECTRO DE RMN DE ¹ H DA LIGNINA ACETILADA PARA OS MATERIAIS PRÉ-TRATADOS B18 E B19.....	136
FIGURA 32	ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA DA LIGNINA EXTRAÍDA COM DIOXANO:HCl _{aq} A PARA O BAGAÇO <i>IN NATURA</i> E PARA OS MATERIAIS PRÉ-TRATADOS B18 E B19.	137

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	MATÉRIAS-PRIMAS E CONDIÇÕES UTILIZADAS PARA O PRÉ-TRATAMENTO A VAPOR DE DIFERENTES MATERIAS LIGNOCELULÓSICOS.....	33
TABELA 2	PLANEJAMENTO FATORIAL 2 ³ PARA O PRÉ-TRATAMENTO POR EXPLOSÃO A VAPOR DO BAGAÇO DE CANA.....	62
TABELA 3	COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR.....	71
TABELA 4	COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS PRINCIPAIS COMPONENTES DO BAGAÇO DE CANA.....	74
TABELA 5	ÓXIDOS PRESENTES NAS CINZAS DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR EXPRESSO EM RELAÇÃO À MASSA TOTAL DE CINZAS.....	76
TABELA 6	RENDIMENTO OBTIDO PARA HOLOCELULOSE E SUAS FRAÇÕES....	78
TABELA 7	COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS CONSTITUINTES DA HOLOCELULOSE, DA α -CELULOSE E DAS HEMICELULOSES A E B.....	79
TABELA 8	GRAU DE POLIMERIZAÇÃO MÉDIO E POLIDISPERSIDADE DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS.....	81
TABELA 9	RAZÃO MOLAR DOS MONOSSACARÍDICAS PRESENTES NO BAGAÇO <i>IN NATURA</i> E NAS FRAÇÕES DELA DERIVADAS (Glc:Xil:Ara).....	81
TABELA 10	GRAU DE CRISTALINIDADE (ICr) DO BAGAÇO <i>IN NATURA</i> , HOLOCELULOSE, α -CELULOSE E HEMICELULOSES.....	82
TABELA 11	COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA LIGNINA E DAS FIBRAS APÓS A EXTRAÇÃO COM DIOXANO: HCl _{aq}	85
TABELA 12	PERCENTUAL DE GRUPOS FUNCIONAIS PRESENTE NA LIGNINA DO BAGAÇO DE CANA.....	86
TABELA 13	ATRIBUIÇÕES DOS SINAIS DE RMN DE ¹ H PARA LIGNINA DIOXANO ACETILADA.....	87
TABELA 14	ATRIBUIÇÕES DOS SINAIS DE RMN DE ¹³ C PARA LIGNINA DIOXANO DO BAGAÇO DE CANA.....	90
TABELA 15	RENDIMENTOS DE RECUPERAÇÃO TOTAL DO BAGAÇO APÓS O PRÉ-TRATAMENTO POR EXPLOSÃO A VAPOR E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA FRAÇÃO INSOLÚVEL EM ÁGUA.....	92
TABELA 16	COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA FRAÇÃO BEV-SA APÓS AO PRÉ-TRATAMENTO.....	95
TABELA 17	BALANÇO DE MASSAS OBTIDO PARA AS FRAÇÕES BEV-SA E BEV-IA APÓS AO PRÉ-TRATAMENTO POR EXPLOSÃO A VAPOR.....	97

TABELA 18	BALANÇO DE MASSAS TOTAL (BEV-SA E BEV-IA) OBTIDO APÓS O PRÉ-TRATAMENTO.....	98
TABELA 19	TABELA DE ANOVA OBTIDA UTILIZANDO COMO RESPOSTA RECUPERAÇÃO DE ANIDROGLUCOSE (%) APÓS O PRÉ-TRATAMENTO	99
TABELA 20	TABELA DE ANOVA OBTIDA UTILIZANDO COMO RESPOSTA CONCENTRAÇÃO DE FURFURAL NA FRAÇÃO BEV-SA.....	103
TABELA 21	CONCENTRAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS PRESENTES NAS FRAÇÕES BEV-SA APÓS AO PRÉ-TRATAMENTO.....	108
TABELA 22	CONVERSÃO EM EQUIVALENTES DE GLUCOSE APÓS A HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DOS SUBSTRATO PRÉ-TRATADOS E LAVADOS COM ÁGUA.....	110
TABELA 23	EQUIVALENTES DE GLUCOSE LIBERADA DURANTE A HIDRÓLISE ENZIMÁTICA.....	113
TABELA 24	CONCENTRAÇÃO DE GLUCOSE E PRODUÇÃO DE ETANOL OBTIDO NOS EXPERIMENTOS DE SSF PARA PYCC 4072 E THERMOSSAC® DRY DE <i>S. cerevisiae</i>	121
TABELA 25	RENDIMENTO EM ETANOL OBTIDO POR SSF UTILIZANDO DE BAGAÇO DE CANA E DIFERENTES LINHAGENS DE <i>S. cerevisiae</i>	122
TABELA 26	DADOS EXPERIMENTAIS SOBRE A INIBIÇÃO DE FURANOS EM PROCESSOS FERMENTATIVOS UTILIZANDO <i>S. cerevisiae</i> (TABELA ADAPTADA DE ALMEIDA <i>et al.</i> , 2009).....	128
TABELA 27	COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA FRAÇÃO BEV-IA DO BAGAÇO DE CANA APÓS O PRÉ-TRATAMENTO POR EXPLOSÃO A VAPOR PARA AS CONDIÇÕES SELECIONADAS.....	130
TABELA 28	MODIFICAÇÕES NO BAGAÇO DE CANA APÓS AO PRÉ-TRATAMENTO POR EXPLOSÃO A VAPOR EM COMPARAÇÃO COM O BAGAÇO <i>IN NATURA</i>	131
TABELA 29	RENDIMENTO DE RECUPERAÇÃO E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA LIGNINA APÓS A EXTRAÇÃO COM DIOXANO:HCl _{aq}	133
TABELA 30	PERCENTUAL DE GRUPOS FUNCIONAIS PRESENTES NA LIGNINA DIOXANO:HCl _{aq}	134
TABELA 31	ATRIBUIÇÕES DOS SINAIS DE RMN DE ¹ H PARA LIGNINA DIOXANO ACETILADA.....	135

LISTA DE ABREVIATURAS

AFEX: explosão a vapor com amônia líquida
AH: autohidrólise
AIE: Administração de Informação de Energia dos Estados Unidos
AnAra: anidroarabinose
AnGlc: anidrogucose
ANOVA: análise de variância
AnXyl: anidroxilose
AQ: água quente
Ara: arabinose
ATG: análise termogravimétrica
BEV-IA: fração insolúvel do bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor
BEV-SA: fração solúvel do bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor
BEV-SL: bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor sem lavar
BIN: bagaço de cana *in natura*
BINE: bagaço de cana *in natura* livre de extraíveis
CBH: celobiohidrolase
CBP: bioprocesso consolidado
CF: cofermentação de pentoses e hexoses
CLAE: cromatografia a líquido de alta eficiência
Da: dalton
DCM : diclorometano
DRX: difração de raios-X
EC: eletroforese capilar
EE: éter etílico
EG: endoglucanase
EqGlc: equivalentes de glucose
ET: etanol:tolueno 1:2 (v.v⁻¹)
EtOH: etanol
F: furfural
FPU: unidades de papel de filtro, unidade de medida utilizada para expressar a atividade celulásica total segundo a IUPAC
FTIR: espectrometria no infravermelho com transformada de Fourier
g.L⁻¹: grama por litro
Glc : glucose
GP: grau de polimerização

GPC: cromatografia de permeação em gel

GP_M: massa molar média

Hemi A: hemicelulose A

Hemi B: hemicelulose B

HMF: hidroximetilfurfural

ICr: índice de cristalinidade

IUPAC: união internacional de química pura e aplicada

LI: líquido iônico

mL: mililitro

MMA: massa molar aparente

MM_M: massa molecular média (ou média ponderada das massas moleculares)

MM_N: número molecular médio (ou média aritmética das massas moleculares)

PD: polidispersidade

PH: pós-hidrólise com ácido sulfúrico diluído

PH: pós-hidrólise com ácido sulfúrico diluído

RID: índice de refração

RMN de ¹³C: ressonância magnética nuclear de carbono-13

RMN de ¹H: ressonância magnética nuclear de hidrogênio-1

SHF: sacarificação e fermentação em separado

S_N2: substituição nucleofílica de segunda ordem

SSCF: sacarificação e cofermentação simultâneas

SSF: sacarificação e fermentação simultâneas

SSFF: sacarificação, filtração e fermentação simultâneas

T: temperatura (°C)

t: tempo (min)

ton: tonelada

UCB: unidades de celobiose, unidade de medida utilizada para expressar a atividade celobiásica total segundo a IUPAC

UV : espectrofotometria de absorção no ultravioleta

Xyl: xilose

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1. Composição Química de Materiais Lignocelulósicos	17
1.2. Fundamentos das Principais Etapas Envolvidas na Produção de Etanol Celulósico	22
1.2.1. Pré-tratamento de Materiais Lignocelulósicos	22
1.2.2. Hidrólise Enzimática de Materiais Lignocelulósicos	34
1.2.3. Fermentação.....	42
1.3. Pré-tratamento de Bagaço de Cana na Presença de Ácido Fosfórico (H_3PO_4).....	44
1.4. Processos de Produção de Etanol Celulósico.....	46
1.5. Cenário Atual da Produção de Etanol Celulósico	48
2. OBJETIVOS	51
3. MATERIAL E MÉTODOS	52
3.1. Material	52
3.2. Métodos.....	52
3.2.1. Determinação da massa seca	53
3.2.2. Determinação do teor de cinzas.....	54
3.2.3. Determinação da composição inorgânica das cinzas	54
3.2.4. Extraíveis	54
3.2.5. Determinação do teor de proteínas	55
3.2.6. Análise química pelo método da lignina de Klason.....	55
3.2.7. Determinação do grau de polimerização por cromatografia de permeação em gel (GPC)	56
3.2.8. Isolamento e caracterização dos principais componentes do bagaço	57
3.2.8.1. Holocelulose, hemiceluloses e α -celulose	57
3.2.8.2. Lignina	58
3.2.8.2.1. Hidroxilas fenólicas da lignina	59
3.2.8.2.2. Hidroxilas alifáticas da lignina	59
3.2.8.2.3. Hidroxilas totais.....	60
3.2.8.2.4. Grupamentos ácidos	60
3.2.8.2.5. Carbonilas.....	60
3.2.8.2.6. Acetilação da lignina	61
3.2.9. Determinação do índice de cristalinidade (ICr).....	61
3.2.10. Condições de pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar	62
3.2.11. Pré-tratamento do bagaço por explosão a vapor.....	63

3.2.12. Determinação de ácidos fenólicos na fração BEV-SA por eletroforese capilar	65
3.2.13. Hidrólise enzimática	65
3.2.14. Modelagem matemática	66
3.2.15. Manutenção dos microrganismos	66
3.2.15.1. Meio de cultura	66
3.2.15.2. Condições de crescimento	66
3.2.15.3. Preparo do pré-inóculo	67
3.2.15.4. Crescimento celular	67
3.2.15.5. Quantificação do crescimento celular	67
3.2.15.6. Determinação da temperatura para os experimentos de fermentação	67
3.2.16. Fermentação	68
3.2.17. Crescimento celular na presença de furfural	69
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	70
4.1. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO BAGAÇO DE CANA IN NATURA	70
4.1.1. Composição química do bagaço de cana	70
4.1.2. Caracterização das cinzas	75
4.1.3. Isolamento e caracterização dos principais componentes do bagaço de cana ..	77
4.1.3.1. Holocelulose, hemiceluloses e α -celulose	77
4.1.4. Lignina	84
4.2. PRÉ-TRATAMENTO POR EXPLOSÃO A VAPOR DO BAGAÇO DE CANA	91
4.2.1. Recuperação total e composição química da fração BEV-IA	91
4.2.2. Modelagem Matemática	98
4.2.2.1. Efeito do pré-tratamento sob a recuperação total de celulose (glucose)	99
4.2.2.2. Efeito do pré-tratamento sob produção de furfural na fração BEV-SA	101
4.2.3. Quantificação de compostos fenólicos	Erro! Marcador não definido.
4.3. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO BAGAÇO DE CANA PRÉ-TRATADO A VAPOR	110
4.4. FERMENTAÇÃO DAS CONDIÇÕES ÓTIMAS DE PRÉ-TRATAMENTO	112
4.4.1. Hidrólise enzimática dos substratos selecionados	112
4.4.2. Determinação da temperatura ótima para os ensaios de fermentação	115
4.4.3. Hidrólise e fermentação em separado (SHF)	116
4.4.4. Fermentação e sacarificação simultâneas (SSF)	119
4.4.5. Crescimento celular na presença de inibidores	124
4.5. MODIFICAÇÕES QUÍMICAS DO BAGAÇO DE CANA APÓS AO PRÉ- TRATAMENTO POR EXPLOSÃO A VAPOR	128
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	140

1. INTRODUÇÃO

O etanol é um dos mais importantes combustíveis renováveis e seu uso em grande escala contribui diretamente para a redução do impacto ambiental do uso indiscriminado de combustíveis fósseis. Sua produção está baseada na fermentação alcoólica dos carboidratos presentes, por exemplo, no caldo de cana-de-açúcar (modelo brasileiro) ou em hidrolisados enzimáticos do amido de milho (modelo norte-americano). Por outro lado, resíduos florestais e agroindustriais também podem ser utilizados para este mesmo fim (HAHN-HAGERDAL *et al.*, 2011; SOCCOL *et al.*, 2010). Neste caso, o processo fermentativo é baseado nos carboidratos liberados da biomassa vegetal por hidrólise da celulose e das hemiceluloses (CHIARAMONTIA *et al.*, 2012; GEDDES *et al.*, 2010).

O aproveitamento de resíduos agroindustriais como o bagaço de cana para a produção de etanol celulósico representa uma das mais importantes alternativas para a consolidação de um modelo sustentável que esteja voltado à produção de combustíveis renováveis para o setor de transportes (HAHN-HAGERDAL *et al.*, 2011; SUKUMARAN *et al.*, 2009). Neste sentido, o presente projeto de pesquisa foi orientado ao estudo do pré-tratamento por explosão a vapor do bagaço de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), visando à maximização dos rendimentos de recuperação dos principais componentes da biomassa, ao aumento da suscetibilidade da celulose à hidrólise enzimática e à produção de etanol celulósico a partir dos melhores substratos.

A produção de cana-de-açúcar no Brasil, segundo as estatísticas da União da Indústria de Cana-de-açúcar (Única), foi de 596,63 milhões de toneladas na safra de 2012/2013, com uma produtividade de 70.000 kg por hectare, sendo que aproximadamente 50,4% destinada para açúcar e 49,6% para o etanol. Tais números representam uma produção de 39 milhões de toneladas de açúcar e 23 milhões de m³ de etanol no país, além de cerca de 150 milhões de toneladas de bagaço. Embora boa parte deste bagaço esteja sendo utilizado para fins energéticos, tais quantidades representam uma oportunidade que a agroindústria não pode desprezar. Há, portanto, um amplo reconhecimento de que a produção anual de bagaço de cana atinge cifras vultuosas e que o aproveitamento destes resíduos é uma necessidade nacional, com amplo espaço para o desenvolvimento de atividades mais nobres do que a geração direta de energia por combustão ou gaseificação.

Os materiais lignocelulósicos como o bagaço de cana-de-açúcar são constituídos majoritariamente por celulose, hemiceluloses e lignina, além de outros componentes minoritários. Tais componentes se encontram nas seguintes proporções, de acordo com a literatura especializada: 40-45% de celulose, 22-25% de hemiceluloses, 23-30% de

lignina, 1,5-4,3% de extraíveis, 1,5-3,0% de cinzas (ROCHA *et al.*, 2012; QIU *et al.*, 2012), sendo que a amplitude destes intervalos depende da origem e das condições empregadas na sua produção.

1.1. Composição Química de Materiais Lignocelulósicos

A celulose é a base estrutural da parede celular de plantas e corresponde ao polissacarídeo de maior ocorrência natural. Trata-se de um homopolissacarídeo composto exclusivamente por unidades de D-glucose ligadas por ligações glicosídicas do tipo β -(1 \rightarrow 4), cuja estrutura supramolecular tende à linearidade através da orientação equatorial das hidroxilas anoméricas (**FIGURA 1**). No entanto, a análise conformacional da celulose indicou que a celobiose (4-O- β -D-glucopiranosil- β -glucopiranoose) representa a sua unidade estrutural básica (FENGEL e WEGNER, 1989). Tal fato é justificado pela disposição conformacional que é observada a cada segunda unidade glucopiranosídica disposta ao longo da cadeia. Esta conformação é a base da associação molecular, observada entre as cadeias adjacentes do homopolímero por favorecer a formação de um agregado fortemente estabilizado por ligações de hidrogênio.

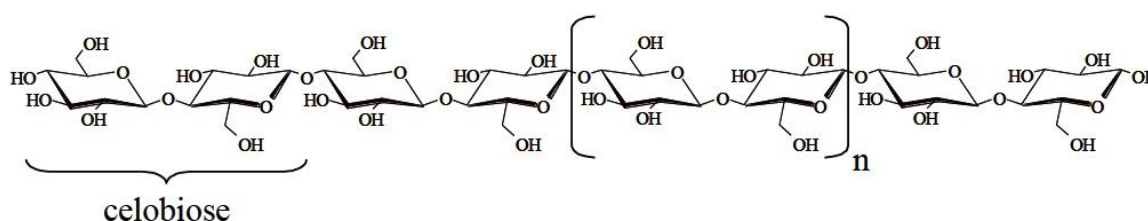


FIGURA 1. REPRESENTAÇÃO DA CADEIA LINEAR DA CELULOSE, FORMADA POR VÁRIAS UNIDADES CONSECUTIVAS DE CELOBIOSE (TÍMÁR-BALÁZSY e EASTOP, 1998).

O tamanho ou extensão da cadeia de celulose é medido através de seu grau de polimerização (GP), que representa o número de unidades de anidrogucose que formam cada cadeia polimérica. O GP da celulose varia de acordo com a fonte, o grau de maturação da parede celular, o processamento a que as fibras foram submetidas e o seu envelhecimento (FENGEL e WENEGER, 1989). O GP da celulose varia de 1000 a 15000 unidades de anidrogucose, sendo que a celulose oriunda de plantas superiores podem atingir GP superiores a 10 000 unidades. Todos os processos que envolvem o isolamento e utilização da celulose para fins industriais geram uma diminuição no seu GP. No processo de polpação *kraft* o GP da madeira decresce na faixa de 1000 a 1300, enquanto que em processos baseados na hidrólise ácida, tal decréscimo pode chegar a valores na

faixa de 250 a 300 unidades de anidroglicose (FAN *et al.*, 1987; FENGEL e WENEGER, 1989).

Em sua estrutura supramolecular, a celulose apresenta regiões altamente ordenadas (regiões cristalinas), estabilizadas por numerosas ligações de hidrogênio intra e intermoleculares, e áreas menos ordenadas ou amorfas, onde as cadeias apresentam uma orientação randomizada (LAUREANO-PEREZ *et al.*, 2005; FAN *et al.*, 1987). A proporção da parte cristalina é normalmente expressa em porcentagem (índice de cristalinidade ou ICr) e depende da origem e do processo de obtenção da celulose. Vários autores têm sugerido que a celulose amorfa, devido a sua maior área superficial, é mais suscetível à hidrólise ácida, alcalina ou enzimática do que a forma ordenada ou cristalina (SJÖSTRÖM e WESTERNARK, 1999; CONVERSE e WARE, 1994; WOOD e SADDLER, 1988).

Atualmente, sabe-se que a celulose possui sete formas cristalinas, sendo elas I α , I β , II, III_I, III_{II}, IV_I e IV_{II}. Cada uma destas formas apresenta características físicas e químicas próprias, como solubilidade, densidade, ponto de fusão e forma do cristal, além de propriedades ópticas e elétricas (OGEDA e PETRI, 2010). A celulose I (I α e I β) é o produto direto da biossíntese e por isso é denominada celulose nativa. Já as demais formas são de natureza sintética, onde, através de tratamentos térmicos ou alcalinos, as cadeias da celulose nativa se abrem e se recombinaem de forma aleatória, dando origem a uma nova forma amorfa.

As hemiceluloses são polissacarídeos que contêm pelo menos dois tipos de monossacarídeos em sua estrutura primária, que podem corresponder a diferentes tipos de hexoses (D-glucose, D-manose e D-galactose), pentoses (D-xilose, L-arabinose e L-ramnose) e, em alguns casos, ácidos urônicos (ácido 4-O-metil-glucurônico e ácido galacturônico) (**FIGURA 2**). Parte destas unidades se apresentam como ramificações da cadeia principal e estas interagem facilmente com a celulose, dando estabilidade e/ou flexibilidade ao agregado (RAMOS, 2003). As hemiceluloses são constituídas por cadeias poliméricas menores que as da celulose e são depositados na parede celular em um estágio anterior à lignificação. O teor e a proporção dos diferentes componentes encontrados nas hemiceluloses variam grandemente com a espécie e, provavelmente, de árvore para árvore e de tecido para tecido em um mesmo espécime. Como exemplo, as hemiceluloses de gramíneas (cana-de-açúcar) são compostas majoritariamente por heteroxilanas altamente acetiladas, geralmente classificadas com 4-O-metil-glucuronoxilanas (SJÖSTRÖM e WESTERNARK, 1999; FENGEL e WEGENER, 1989).

As hemiceluloses, ao contrário da celulose, são majoritariamente ramificadas e amorfas. Logo, a maioria dos agentes químicos atinge-as mais facilmente do que à celulose, que possui regiões de alta organização estrutural e baixa acessibilidade

molecular. No entanto, as hemiceluloses podem perder alguns substituintes de sua cadeia e sofrer cristalização induzida quando submetidas a tratamentos químicos ou térmicos, com formação de fortes ligações de hidrogênio entre os grupos hidroxilas de cadeias adjacentes (DENCE e REEVE, 1996). A formação deste retículo cristalino diminui a acessibilidade do produto, tornando mais difícil o acesso de agentes químicos e/ou biológicos ao componente hemicelulósico.

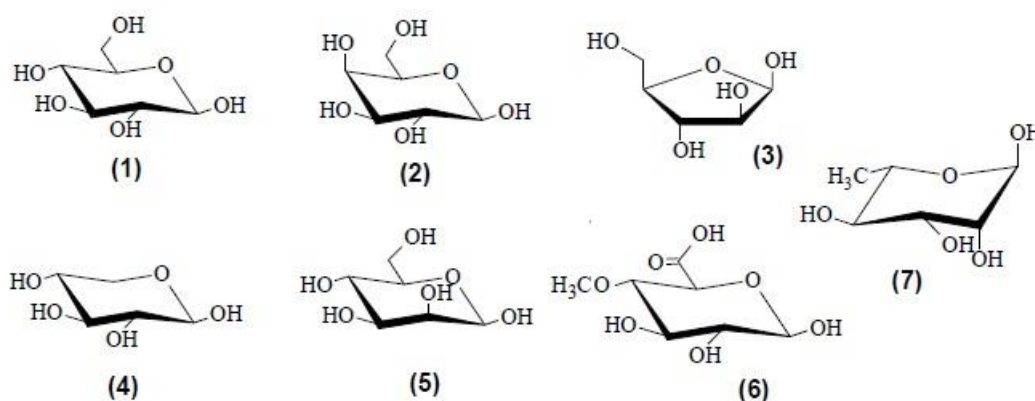


FIGURA 2. MONOSSACARÍDEOS CONSTITUINTES DAS HEMICELULOSES. D-GLUCOSE (1), D-GALACTOSE (2), L-ARABINOSE (3), D-XILOSE (4), D-MANOSE (5), 4-O-METIL-D-GLUCURÔNICO (6) E L-RAMNOSE (7) (SJÖSTRÖM e WESTERNARK, 1999).

Além da hemiceluloses e da celulose, outros polissacarídeos são encontrados na parede celular vegetal, dentre eles a pectina, que faz parte de um grupo de substâncias denominadas substâncias pécticas, as quais incluem o ácido péctico, o ácido pectínico e protopectina. As substâncias pécticas são formadas por unidades de ácido- α -D-galacturônico, originando um polissacarídeo complexo e de alta massa molar (CAMPBELL *et al.*, 1979). Este componente atua como agente cimentante na parede celular, contribuindo para firmeza, resistência mecânica e coesividade do tecido vegetal.

O ácido péctico e ácido pectínico possuem estruturas similares. Entretanto, o ácido pectínico apresenta em sua estrutura unidades de ácido galacturônico esterificados (VORAGEN *et al.*, 2009), o que facilita a sua extração com água quente; assim, quanto maior o grau de esterificação maior será sua solubilidade. Já a protopectina consiste na forma natural da pectina, quando associada a celulose, hemiceluloses e lignina. A protopectina, por sua vez, é pouco solúvel em água mas pode ser facilmente atacada por ácidos diluídos, formando ácidos pécticos e pectínicos de diferentes massas molares e composição (CANTERI *et al.*, 2012). Segundo Ishii (1997) o percentual de pectina

presente em gramíneas pode variar de 0,1 a 5%, dependendo do tempo de crescimento da planta, e quanto maior a sua idade, maior será o seu teor.

A lignina é, depois da celulose e das hemiceluloses, o polímero mais abundante na natureza e está presente na parede celular como um material polifenólico amorfo com estrutura tridimensional baseada em três precursores monoméricos: os álcoois coniferílico, sinapílico e *p*-cumarílico (DENCE e LIN, 1992) (**FIGURA 3**). Diferentemente da celulose e de outros polímeros naturais, as ligninas apresentam uma estrutura macromolecular em que as unidades monoméricas não se repetem de forma regular e encontram-se entrelaçadas por diferentes ligações carbono-carbono entre as cadeias alifáticas (β - β' , α - α' , α - β'), entre as cadeias alifáticas e os anéis aromáticos (β -5', β -1', α -1', β -6') e entre carbonos aromáticos (5-5'), além de ligações etéreas envolvendo cadeias alifáticas e anéis aromáticos (β -O-4', α -O-4') (HIGUCHI, 1985) (**FIGURA 4**).

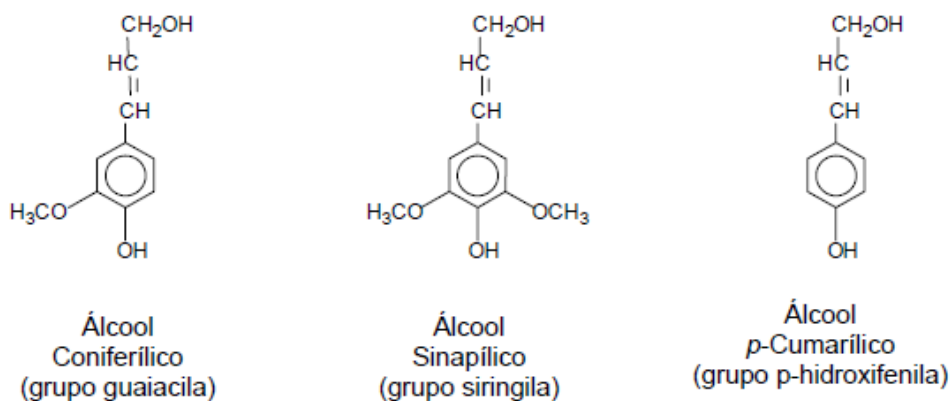


FIGURA 3. ESTRUTURA DOS ÁLCOOIS PRECURSORES DA LIGNINA (SJÖSTRÖM, 1992).

As ligninas presentes nos vegetais diferem entre si pelo grau de metoxilação dos monômeros e pelo grau de ligação carbono-carbono entre os mesmos (GOLDSTEIN, 1981). As ligninas de coníferas são quase que exclusivamente compostas por resíduos derivados do álcool coniferílico e são frequentemente denominadas de ligninas guaiacilas (lignina do tipo G), enquanto as ligninas das folhosas contêm resíduos derivados dos álcoois coniferílico e sinapílico e são denominadas de ligninas guaiacil-siringilas (lignina tipo GS). Em contraste, as ligninas derivadas de gramíneas contêm os três precursores básicos citados acima (lignina tipo HGS). Como consequência, as ligninas das folhosas possuem alta quantidade de grupos metoxílicos, são menos condensadas e são mais suscetíveis à conversão química do que as ligninas derivadas das coníferas (RAMOS, 2003).

A lignina tem um importante papel no transporte de água, nutrientes e metabólitos, sendo responsável pela resistência mecânica de vegetais, além de proteger os tecidos

lignificados contra o ataque de microrganismos (MESQUITA, 1990; FENGEL e WEGENER, 1989; CARIOCA, 1984).

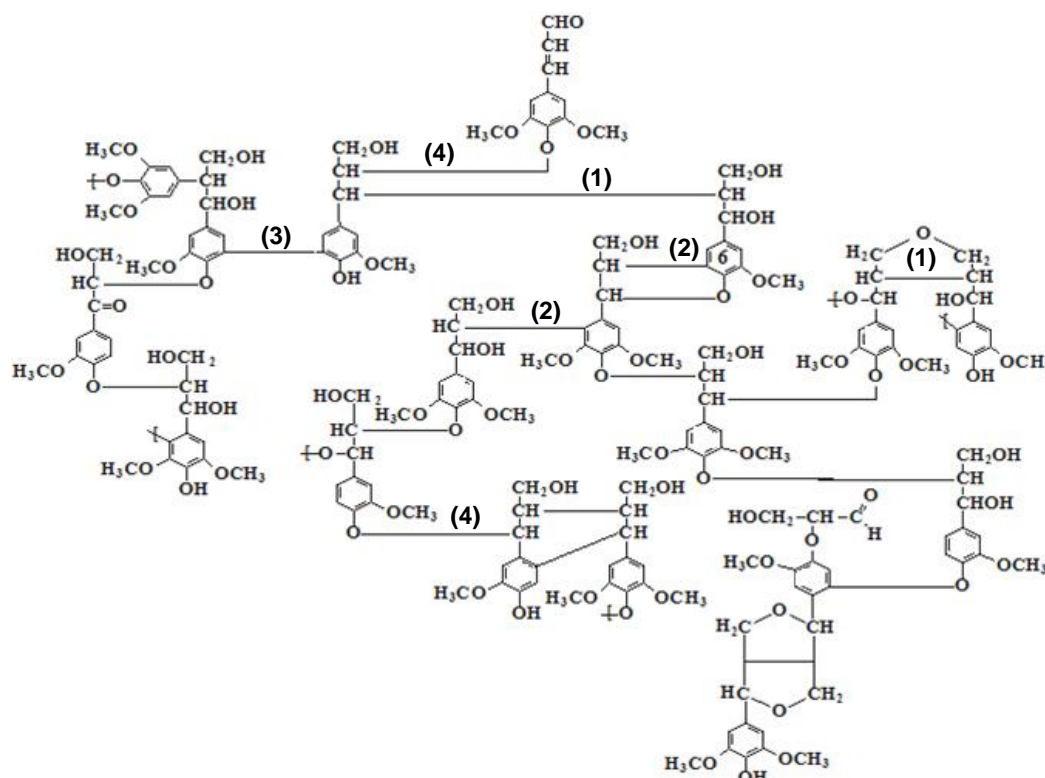


FIGURA 4. ESTRUTURA MACROMOLECULAR DA LIGNINA E REPRESENTAÇÃO DAS LIGAÇÕES ENTRE: (1) CARBONO-CARBONO DE CADEIAS ALIFÁTICAS; (2) CADEIAS ALIFÁTICAS E ANÉIS AROMÁTICOS; (3) CARBONOS AROMÁTICOS E (4) CADEIAS ALIFÁTICAS E ANÉIS AROMÁTICOS.

Finalmente, há componentes que não estão ligados diretamente à parede celular, os quais incluem uma variedade de compostos orgânicos cuja presença é governada por uma série de fatores, entre os quais os de natureza genética e climática. Estes metabólitos secundários denominados, extraíveis são substâncias de baixa massa molar que estão envolvidas em várias atividades metabólicas da planta, como defesa contra organismos invasores e na síntese de macromoléculas de função estrutural e de reserva.

Os extraíveis podem ser divididos, basicamente, em duas classes. A primeira classe engloba materiais conhecidos como extraíveis por serem removidos em água e solventes orgânicos neutros ou por arraste de vapor. A segunda classe engloba materiais que não são comumente extraíveis com os agentes mencionados, como, por exemplo, compostos inorgânicos (cinzas) e proteínas (KLOCK *et al.*, 2005). Em geral, os seguintes compostos podem estar presentes nos extraíveis: terpenos, lignanas, estilbenos, flavonóides, ácidos fenólicos, gorduras, ceras, ácidos graxos, álcoois, esteróides e

hidrocarbonetos de elevada massa molar. Esses constituintes são freqüentemente responsáveis por determinadas características da planta, como cor, cheiro, resistência natural ao apodrecimento, sabor e propriedades abrasivas (D'ALMEIDA, 1988). Segundo CARVALHO (2011), os extrativos do bagaço de cana-de-açúcar são representados por uma variedade de compostos como terpenos, terpenóides, gorduras, ceras, compostos fenólicos e cinzas.

Como resultado do grau de associação molecular existente entre os três componentes poliméricos majoritários da fitobiomassa, somada à interveniência dos extrativos, a caracterização desses materiais constitui uma difícil tarefa experimental. Além disso, esta organização estrutural dificulta a utilização destes materiais como matérias-primas para processos químicos e biotecnológicos, razão pela qual há a necessidade do emprego de um método de pré-tratamento que amenize a interação entre os principais componentes da fitobiomassa e os torne susceptíveis à conversão em biocombustíveis e/ou insumos para a indústria química.

1.2. Fundamentos das Principais Etapas Envolvidas na Produção de Etanol Celulósico

A produção de etanol celulósico envolve diferentes etapas como o preparo da matéria-prima, o pré-tratamento, a lavagem do substrato para remoção de inibidores, a hidrólise enzimática ou sacarificação da celulose, a fermentação das hexoses, a fermentação das pentoses, a recuperação do etanol e a separação e tratamento de efluentes. Tais etapas podem ser realizadas em unidades independentes ou integradas, como mostra a **FIGURA 5**, sendo que a integração dessas visa diminuir as dificuldades técnicas inerentes ao processo e, naturalmente, a redução de seu custo operacional, que ainda representa um dos principais obstáculos a serem superados (RAMOS, 2003; e SÁNCHEZ e CARDONA, 2008). Quatro possíveis estratégias de integração têm sido investigadas nestas últimas décadas: a cofermentação de pentoses e hexoses (CF); a sacarificação e fermentação simultâneas (SSF); a sacarificação e cofermentação simultâneas (SSCF) e o bioprocessos consolidado (CBP) (SCHLITTLER *et al.*, 2012). No entanto, vários autores têm demonstrado que, dependendo das condições operacionais, a realização da hidrólise e fermentação em separado (SHF) pode se mostrar vantajosa em relação aos demais processos (SÁNCHEZ e CARDONA, 2008).

1.2.1. Pré-tratamento de Materiais Lignocelulósicos

O primeiro passo para a utilização de materiais lignocelulósicos como matérias-primas para processos químicos e/ou biotecnológicos é amenizar a interação existente entre os principais componentes da fitobiomassa, razão pela qual há a necessidade do emprego de um método de pré-tratamento. O objetivo de qualquer método de pré-tratamento está em alterar ou remover barreiras estruturais e tornar esses materiais mais suscetíveis à conversão em biocombustíveis e/ou insumos para a indústria química (CHIARAMONTIA *et al.*, 2012; HAHN-HAGERDAL *et al.*, 2011; GÁMEZ *et al.*, 2006; RAMOS, 2003). Segundo Balat *et al.* (2008), um bom método de pré-tratamento deve satisfazer os seguintes requisitos: melhorar a produção de açúcares ou produzir substratos que poderão ser facilmente convertidos a açúcares livres por hidrólise ácida ou enzimática; evitar a perda de carboidratos por reações de desidratação; evitar a formação de subprodutos que possam inibir as etapas subsequentes de hidrólise enzimática e fermentação; ser ambientalmente correto; e ser economicamente viável.

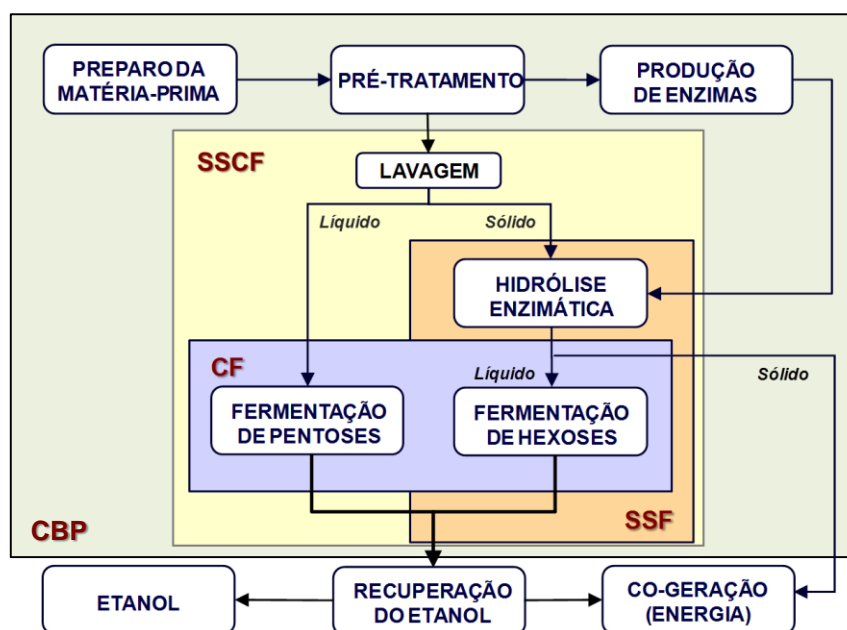


FIGURA 5. DIGRAMA GLOBAL DE PRODUÇÃO DE BIOETANOL A PARTIR DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA (PITARELO *et al.*, 2010).

Vários métodos de pré-tratamento têm sido propostos na literatura para separação e aproveitamento de materiais lignocelulósicos. Tais métodos são baseadas em processos físicos, químicos, biológicos ou na combinação destes. Dos vários processos descritos na literatura, os mais comuns são baseados no emprego de álcali (PARK e KIM, 2012; HERNÁNDEZ-SALAS *et al.*, 2009; HENDRIKS e ZEEMAN, 2009; BALAT *et al.*, 2008; DAWSON e BOOPATHY, 2008; HAMELINCK *et al.*, 2005), hidrólise ácida (CHEN *et al.*, 2011; BALAT *et al.*, 2008; CARA *et al.*, 2008; ZHANG *et al.*, 2007; TAHERZADEH e

KARIMI, 2007), explosão a vapor (PITARELO *et al.*, 2012; HERNÁNDEZ-SALAS *et al.*, 2009; HENDRIKS e ZEEMAN, 2009; BALAT *et al.*, 2008; MARTÍN *et al.*, 2008; RAMOS, 2003; CUNHA *et al.*, 2001; GLASSER e WRIGHT, 1997), água quente (LASER *et al.*, 2002; SUN e CHENG, 2002), oxidação úmida (*Wet Oxidation*) (HENDRIKS e ZEEMAN, 2009; MARTÍN *et al.*, 2008), amônia líquida (*Ammonia Fibre Explosion* ou AFEX) (HENDRIKS e ZEEMAN, 2009; BALAT *et al.*, 2008; HAMELINCK *et al.*, 2005), líquidos iônicos (TAN *et al.*, 2011; NGUYEN *et al.*, 2010; LI *et al.*, 2010; ZHENG *et al.*, 2009), moagem (INOUE *et al.*, 2009; BUABAN *et al.*, 2010) e pré-tratamento biológico (ZHANG *et al.*, 2011, SAAD *et al.*, 2008; CAMASSOLA e DILLON, 2009; DAWSON e BOOPATHY, 2008; HAMELINCK *et al.*, 2005; MARTÍN *et al.*, 2002; PANDEY *et al.*, 2000; LEE, 1997), todos com o propósito de desagregar a estrutura associativa da lignocelulose para produzir combustíveis renováveis ou insumos químicos a partir da biomassa.

Pré-tratamentos físicos buscam a redução do tamanho das partículas através de moagem, aumentando assim a área superficial e a acessibilidade do substrato aos processos de hidrólise (BUABAN *et al.*, 2010; ALVIRA *et al.*, 2010). A principal vantagem deste processo é a não geração de produtos de desidratação de carboidratos (compostos furânicos), formados geralmente em processos termoquímicos baseados no efeito da hidrólise ácida (BUABAN *et al.*, 2010; BELKACEMI e ALVO, 1997). Embora aumentem o percentual de sacarificação da celulose, estes processos de pré-tratamento não são atraentes devido ao seu alto custo energético (HENDRIKS e ZEEMAN, 2009).

Os pré-tratamentos biológicos geralmente utilizam fungos para solubilizar a lignina (BALAT *et al.*, 2008). Entretanto, este processo é considerado lento, proporciona baixos rendimentos e baixa acessibilidade à hidrólise enzimática. Além disso, há relatos na literatura sobre a ocorrência de inibição dos microrganismos por derivados da lignina durante o processo de degradação (HAMELINCK *et al.*, 2003 e 2005). Entretanto, o pré-tratamento biológico possui as vantagens de consumir pouca energia e poder ser realizado em condições ambientes. Muitas vezes, o pré-tratamento biológico é usado em combinação com um tratamento químico (GRAF *et al.*, 2000; LEE, 1997; MA *et al.*, 2010).

No pré-tratamento com água quente, também conhecido como solvólise não-catalítica, a biomassa fica em contato com água comprimida durante 1 a 15 min sob temperaturas que variam de 170 a 230°C. Neste pré-tratamento, ocorre remoção de 90% das hemiceluloses, de 4-22% da celulose e de 35 a 45% da lignina. Segundo Mosier *et al.* (2005), o pré-tratamento com água quente foi capaz de remover até 80% das hemiceluloses presente na palha de milho, evitando a formação de inibidores quando realizado na faixa de pH entre 4 e 7. Nestas condições, os carboidratos da biomassa são recuperados na forma de oligômeros, o que evita a formação de monômeros e, por consequência de produtos de desidratação de pentoses (furfural) e hexoses

(hidroximetilfurfural). Já a lignina é removida da biomassa sem grandes modificações químicas, ocorrendo apenas um leve processo de despolimerização parcial. A desvantagem desse processo está relacionada ao grande consumo de água, que produz hidrolisados muito diluídos, que geram problemas nas etapas subsequentes de bioconversão (CONDE-MEJÍA *et al.*, 2012; LASER *et al.*, 2002; SUN e CHENG, 2002).

No pré-tratamento alcalino oxidativo, a biomassa é tratada com água quente e oxigênio em temperaturas superiores a 120°C. O peróxido de hidrogênio (H₂O₂) também pode ser utilizado como agente oxidante, sob temperaturas entre 30-70°C, com tempos de reação que variam de 2 a 8 h. Neste processo, carbonato de sódio, hidróxido de cálcio ou hidróxido de sódio são utilizados como agentes de extração das hemiceluloses e deslignificação visando aumentar a acessibilidade e a reatividade da celulose (HENDRIKS e ZEEMAN, 2009). O uso da oxidação alcalina úmida para o tratamento de palha de trigo (20 g de palha.L⁻¹, 170°C, 5-10 min) proporcionou índices de sacarificação enzimática da celulose da ordem de 85%. Teixeira *et al.* (1999) investigaram o uso de ácido peracético na temperatura ambiente como método de pré-tratamento para a madeira de álamo e bagaço de cana. A hidrólise enzimática aumentou de 6,8% no material sem pré-tratamento para 98% no material pré-tratado, usando 21% de ácido peracético. Um dos problemas associados a esse processo é que, em muitos casos; oxidante utilizado não é seletivo e, portanto, podem ocorrer perdas de hemicelulose e celulose como também a geração de inibidores de fermentação nos hidrolisados, tais como ácidos orgânicos e compostos fenólicos (MARTÍN *et al.*, 2007; HENDRIKS e ZEEMAN, 2009).

Recentemente, os líquidos iônicos (LIs) têm sido propostos como solventes promissores para o pré-tratamento de materiais lignocelulósicos (SHODA *et al.*, 2012; TAN *et al.*, 2011; ZHU *et al.*, 2006; SWATLOSKI *et al.*, 2002;). Os LIs são altamente eficazes na remoção da lignina e das hemiceluloses e, além disso, reduz a cristalinidade da celulose (LI *et al.*, 2010) e podem ser utilizados no pré-tratamento de diferentes matrizes (NGUYEN *et al.*, 2010; SUN *et al.*, 2009). Os LIs mais utilizados no tratamento da biomassa são os alquilimidazóis, aquilpiridínios, tetra-alquilamonio, tetra-fosfônio, hexafluorofosfato, tetrafluoroborato, metanossulfonatos, trifluorometanol sulfonato e bi-(trifluorometanosulfonil)-imida (TADESSE e LUQUE, 2011). Segundo Zheng e colaboradores (2009) o pré-tratamento da palha de trigo a 130°C por 30 min utilizando fosfato de 1-etil-3-metil-imidazol aumentou a hidrólise da celulose em aproximadamente 55% em apenas 12 h de reação. O pré-tratamento do bagaço de cana com acetato de 1-butil-3-metil imidazol e o dimetil-fosfato de 1,3-dimetil-imidazol em diferentes temperaturas (60-120°C) e tempos de reação (5-120 min), empregando 20 g de LI por grama de bagaço, proporcionou a hidrólise enzimática da celulose de 90% em 24 h de

reação, sendo que, em apenas 6 h, aproximadamente 80% da celulose já tinha sido convertida em celobiose e glucose. Tal resultado foi obtido para o pré-tratamento realizado a 120°C por 120 min utilizando acetato de 1-butil-3-metilimidazol (SILVA *et al.*, 2011). A desvantagem deste processo está relacionada ao seu custo elevado, já que o aumento da acessibilidade da celulose às enzimas exige grande quantidade de LI para dissolução da biomassa, deixando o processo economicamente inviável (SILVA *et al.*, 2011).

Processos alcalinos também podem ser utilizados para o pré-tratamento de materiais lignocelulósicos e seu principal efeito consiste na remoção da lignina da biomassa, promovendo maior conversão das fibras de celulose durante a etapa de hidrólise enzimática. O álcali, geralmente soda ou cal, tende a causar um “inchamento” da biomassa, de modo que a cristalinidade da celulose decresce, enquanto ocorre um incremento da área superficial de contato e da porosidade da mesma (BALAT *et al.*, 2008, HENDRIKS e ZEEMAN, 2009). Tais processos utilizam condições moderadas de operação (temperatura e pressão), em comparação com sistemas ácidos. Entretanto, quando baixas temperaturas (50-65°C) são usadas, os tempos de pré-tratamento podem variar de dias ou semanas (PARK e KIM, 2012). Por outro lado, a combinação de soluções diluídas de NaOH com outro tratamento pode ser ainda mais eficiente. Por exemplo, o pré-tratamento de palha de milho com solução diluída de NaOH (2%), combinada com irradiação, causou um aumento 23% na produção de glucose em relação a palha não tratada (LY *et al.*, 2004). O tratamento alcalino também pode ser realizado por agentes oxidantes como peróxido de hidrogênio (H₂O₂), que geralmente aumenta o rendimento de remoção da lignina (CARVALHEIRO *et al.*, 2008). Alternativamente, a combinação de amônia líquida com explosão a vapor (*Ammonia Fiber Explosion*, AFEX) também representa uma opção tecnológica de grande interesse e esta será abordada mais detalhadamente a seguir.

Pré-tratamentos com ácidos minerais podem ser realizados em meio diluído ou concentrado. Este processo tem como objetivo solubilizar as hemiceluloses, tornando a celulose mais acessível a agentes externos (HENDRIKS e ZEEMAN, 2009). No entanto, a utilização de ácido concentrado é menos atraente devido à necessidade do emprego de etapas de neutralização anteriormente à hidrólise enzimática. Outras desvantagens relacionadas ao pré-tratamento com ácido concentrado são o alto custo operacional e a possível corrosão de equipamentos (WYMAN, 1996). Sendo assim, o pré-tratamento com ácido diluído se apresenta mais atraente para aplicações industriais e tem sido estudado no processamento de vários materiais lignocelulósicos (RODRIGUES, *et al.*, 2010, CASTRO *et al.*, 2008; HSU, *et al.*, 2010).

Dentre todos os métodos utilizados no tratamento de materiais lignocelulósicos, o pré-tratamento com soluções diluídas de ácidos minerais foi um dos mais estudados (SUN e CHENG, 2002; CARA *et al.*, 2008; MOSIER *et al.*, 2005; BALAT *et al.*, 2008). O processo consiste em aquecer uma solução de ácido mineral juntamente com a biomassa no reator em temperaturas que variam de 140 a 200°C, onde cerca de 80-90% das hemiceluloses são recuperadas majoritariamente na forma de monômeros e 30-50% de lignina é passível de extração alcalina. Entretanto, o pré-tratamento com ácido diluído demanda a utilização de matérias-primas previamente moídas (ou seja, de alta área superficial) e de reduzido teor de cinzas, devido ao efeito tamponante das mesmas. O ácido sulfúrico é utilizado frequentemente como agente hidrolítico, embora outros ácidos possam ser utilizados, como os ácidos nítrico, clorídrico e fosfórico (INGRAM *et al.*, 2010; GÁMEZ *et al.*, 2002; SUN e CHENG, 2002). Embora o pré-tratamento com ácido diluído hidrolise quase toda a hemicelulose, seu custo é normalmente mais elevado que outros processos como a explosão a vapor (autohidrólise), a hidrotermólise ou ao uso de amônia líquida (AFEX). Também é necessária a neutralização do hidrolisado para adequação das etapas subsequentes de hidrólise enzimática e fermentação (CONDE-MEJÍA *et al.*, 2012; SUN e CHENG, 2002). O pré-tratamento com ácidos minerais diluídos podem ser combinados com outro processo, como por exemplo ao processo alcalino. Segundo Silva *et al.* (2012) a combinação destes processos aumenta o tamanho dos poros, reduz a cristalinidade da celulose e melhora a conversão enzimática. Tal fato foi atribuído à remoção das hemiceluloses pelo tratamento ácido e da lignina pelo tratamento básico. Por outro lado, os ácidos minerais diluídos também podem ser utilizados como catalisadores auxiliares em processos de explosão a vapor, conforme descrito a seguir.

O pré-tratamento por explosão a vapor tem sido proposto como um dos métodos mais promissores para separar os principais constituintes dos materiais lignocelulósicos (BROWNELL, 1989; EXCOFFIER *et al.*, 1991; RAMOS, 2003; RAMOS e SADDLER, 1994; GLASSER e WRIGHT, 1997; BAUDEL, 2006; BALAT *et al.*, 2008; MARTÍN *et al.*, 2008; HENDRIKS e ZEEMAN, 2009; HERNÁNDEZ-SALAS *et al.*, 2009; ROCHA *et al.*, 2011, 2012; CHIARAMONTI, *et al.*, 2012). Este processo atua tanto quimicamente como fisicamente na transformação do material lignocelulósico e envolve o tratamento da biomassa com vapor saturado em temperaturas de 160 e 240°C, durante um tempo de reação que varia de 2 a 30 min na presença ou ausência de um catalisador ácido. A adição de catalisadores na explosão a vapor, como SO₂ (CARRASCO *et al.*, 2010), CO₂ (SUN e CHENG, 2002; SHEVCHENKO *et al.*, 2000), H₂SO₄, que é o catalisador mais comumente utilizado no processo (CHEN *et al.*, 2011; EMMEL *et al.*, 2003; CARA *et al.*, 2008) e o H₃PO₄ (PITARELO, 2007; PITARELO *et al.*, 2010), pode levar a uma remoção mais completa das hemiceluloses, tornando a biomassa mais suscetível à solvatação e,

por conseguinte, aos processos de hidrólise ácida ou enzimática (HENDRIKS e ZEEMAN, 2009; SUN e CHENG, 2002; CHIARAMONTI *et al.*, 2012). Como vantagens, o pré-tratamento por explosão a vapor requer baixo consumo de energia, se comparado aos processos físicos, tem menor impacto ambiental e exige menor investimento de capital (RUIZ *et al.*, 2008).

O processo AFEX consiste na exposição da biomassa à ação de amônia líquida em temperaturas que variam de 160 a 180°C, sob pressão (9 a 17 bar) e por um período de pré-tratamento que pode variar de 10 a 20 min. Dentre as vantagens deste método está a elevada reatividade da fibra e a geração mínima de inibidores de fermentação (GONG *et al.*, 1999). Entretanto, este processo não promove uma elevada solubilização das hemiceluloses como os processos ácidos, sendo difícil a recuperação das mesmas (HAMELINCK *et al.*, 2005; HOLTZAPPLE *et al.*, 1990). Alizadeh *et al.* (2005) relataram um aumento de seis vezes na hidrólise enzimática da biomassa e 2,5 vezes na produção de etanol após o tratamento prévio com amônia. Esse aumento na hidrólise e na produção de etanol foi atribuído ao inchamento da celulose e à deslignificação do material após o contato com amônia (KIM e LEE, 2005). Além disso, o pré-tratamento utilizando amônia diluída resulta na transição parcial da celulose tipo I para celulose do tipo III, que é menos recalcitrante, justificando assim o aumento da acessibilidade das enzimas ao substrato.

Dentre os diferentes métodos de pré-tratamento descritos acima, a explosão a vapor é visto como um dos melhores e mais rentável processo para separar os principais constituintes da biomassa vegetal e aumentar a sua susceptibilidade à bioconversão (TALEBNIA *et al.*, 2012; ROCHA *et al.*, 2012 e 2011; CORDONA *et al.*, 2010; HENDRIKS e ZEEMAN, 2009; HERNÁNDEZ-SALAS *et al.*, 2009; RAMOS e SADDLER, 1994). Como este estudo foi orientado à otimização do pré-tratamento por explosão a vapor do bagaço de cana na presença e na ausência de catalisador ácido (H_3PO_4), passamos à apresentação de uma abordagem mais detalhada sobre este processo.

O processo de explosão a vapor atua tanto química como fisicamente na estrutura do material lignocelulósico por estar baseado no contato direto da biomassa com vapor saturado a alta pressão por um determinado tempo de exposição no reator, seguido de descompressão rápida à condição atmosférica (explosão). Ao longo deste processo, as ligações que asseguram a coesão da biomassa são fragilizadas e em parte quebradas, de forma que, no momento da descompressão, o material é desfibrado com facilidade e assim reduzido a partículas menores, aumentando a área superficial de contato e diminuindo a resistência da parede celular à sacarificação.

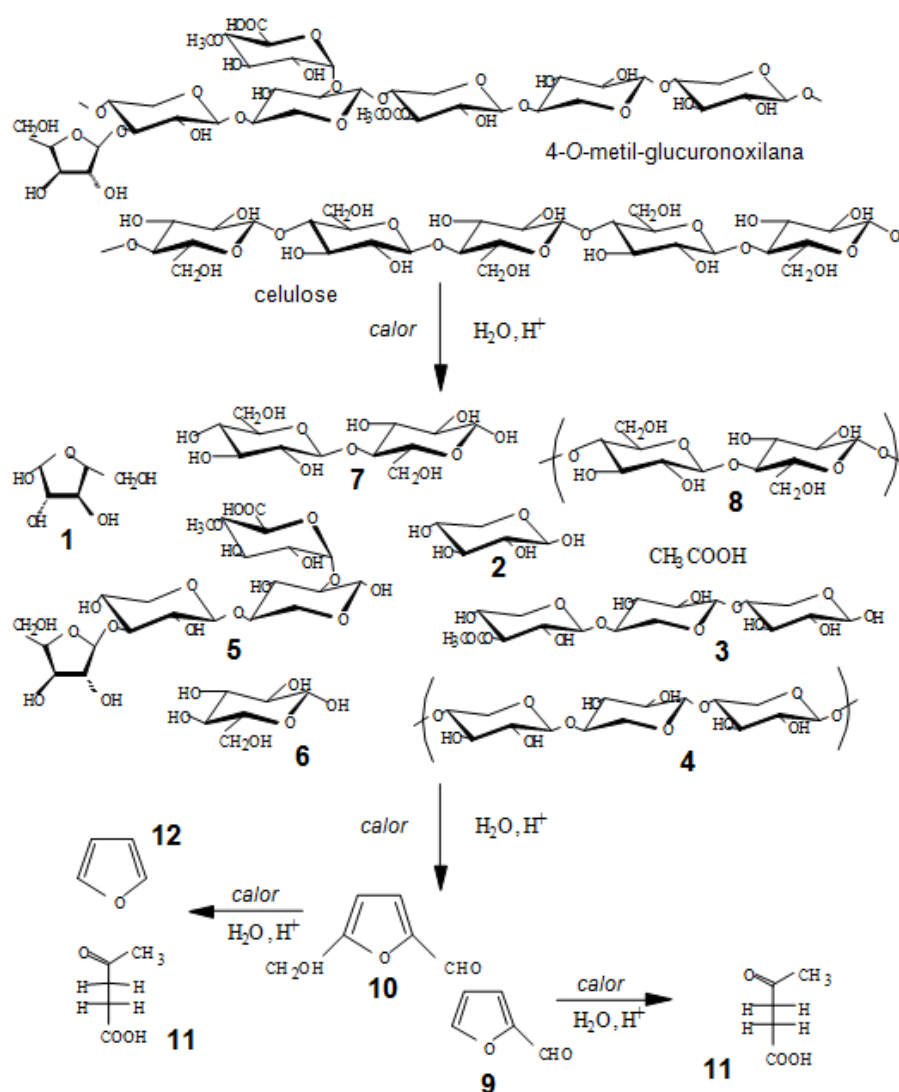
Durante o processo de pré-tratamento por explosão a vapor, todos os componentes da biomassa sofrem hidrólise, mas as hemiceluloses são as mais

susceptíveis a este tipo de reação. Sob a ação da temperatura e da pressão do vapor, os grupamentos acetila presentes nas hemiceluloses são hidrolisados a ácido acético e o ácido liberado no meio catalisa a quebra das ligações do complexo lignina-carboidrato, provocando a solubilização de grande parte das hemiceluloses, que passam a ser facilmente removidas por extração aquosa. A fração insolúvel em água contém celulose e lignina parcialmente modificada, sendo que a maior parte desta lignina pode ser removida por extração com álcali, etanol ou dioxano.

A explosão a vapor não gera apenas monossacarídeos, mas também oligômeros de alta e baixa massa molar, além de outros subprodutos como hidroximetilfurfural, furfural, ácido levulínico, que são formados após as reações de hidrólise e desidratação das hemiceluloses e da celulose (RAMOS, 2003). A **FIGURA 6** mostra os principais componentes formados pela hidrólise ácida da celulose e das hemiceluloses no pré-tratamento por explosão a vapor.

O aumento da temperatura e/ou do tempo de exposição do material no reator favorece as reações de hidrólise da celulose e das hemiceluloses, provoca o início das reações de desidratação das pentoses e hexoses, com a formação de furfural e hidroximetilfurfural (HENDRIKS e ZEEMAN, 2009; RAMOS, 2003). A **FIGURA 7** mostra o mecanismo de formação de furfural a partir xilose em meio ácido. Tal mecanismo consiste em três etapas sequenciais de desidratação, seguido de uma etapa de rearranjo e de fechamento do anel a partir de um ataque nucleofílico intramolecular. A formação de HMF a partir da glucose segue um mecanismo análogo ao descrito para formação de furfural e por isso não foi incluído neste trabalho.

Em relação à lignina, a degradação de parte de sua estrutura libera ácidos fenólicos na fração solúvel e sua quantificação é uma evidência direta da severidade do pré-tratamento. Esta degradação é decorrente de três possíveis reações que podem ocorrer na estrutura da lignina, sendo elas: hidrólise ácida (inclusive a desmetoxilação), clivagem homolítica e reações de condensação envolvendo os diferentes compostos presentes no meio de reação. As reações de hidrólise da lignina ocorrem basicamente pela quebra de ligações aril éter dos tipos α -O-4 e β -O-4 existentes em sua estrutura. A quebra destas ligações promove a liberação de subestruturas de baixa massa molar e de ácidos fenólicos. Além da hidrólise, a clivagem homolítica das ligações aril éter também liberam ácidos fenólicos. Estes compostos, devido sua reatividade, podem sofrer reações de condensação através de ligações carbono-carbono. O resultado destas reações é a formação de uma lignina mais recalcitrante e menos reativa que a lignina de origem.



(1) Arabinose; (2) xilose; (3) xilo-oligômeros (3 resíduos); (4) xilo-oligômeros de alta massa molar; (5) oligossacarídeos ácidos ramificados; (6) glucose; (7) celobiose; (8) celo-aligômeros; (9) furfural; (10) hidroximetilfurfural; (11) ácido levulínico e (12) furano.

FIGURA 6. MODIFICAÇÕES QUÍMICAS QUE OCORREM NAS HEMICELULOSES (4-O-METIL-GLUCURONOXILANA) E NA CELULOSE APÓS AO PRÉ-TRATAMENTO POR EXPLOSÃO A VAPOR. (RAMOS, 2003).

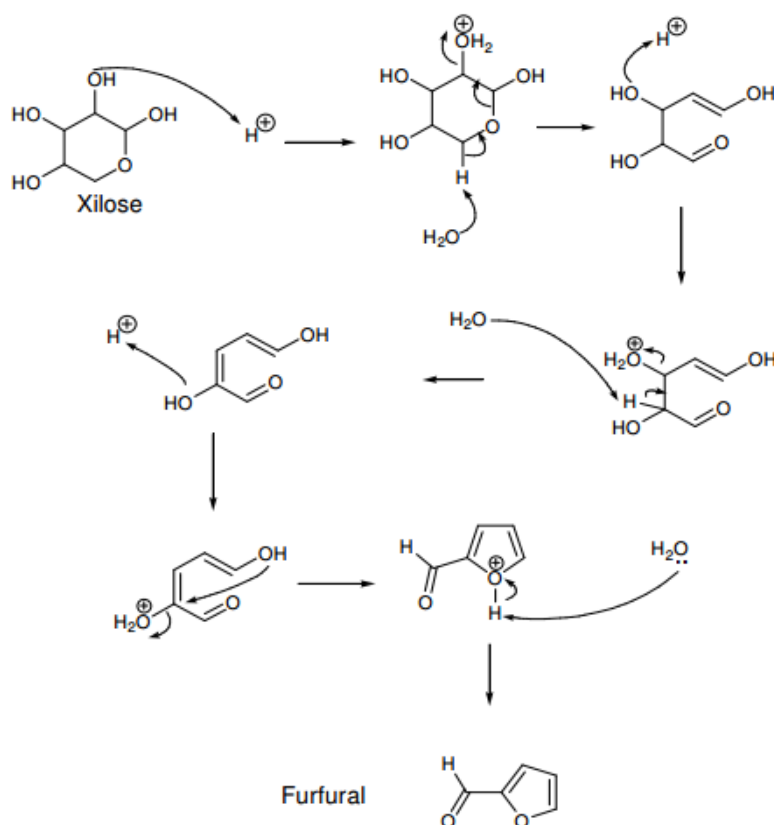
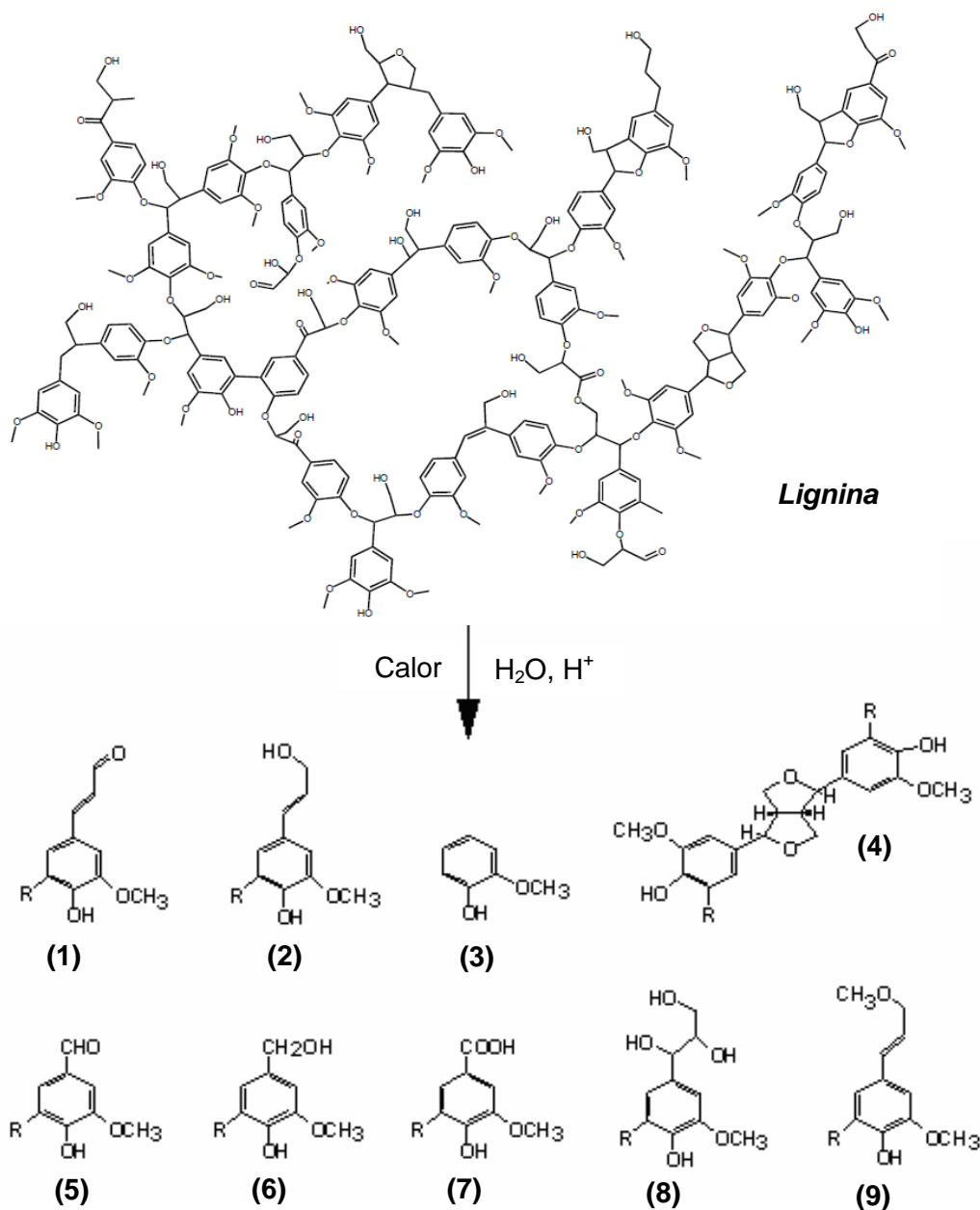


FIGURA 7. MECANISMO DE DESIDRATAÇÃO DE PENTOSSES EM MEIO ÁCIDO, FORMANDO FURFURAL (MAMMAN *et al.*, 2008; SANTANA, 2009).

A **TABELA 1** apresenta as condições empregadas para o pré-tratamento por explosão a vapor de diferentes materiais lignocelulósicos. Este processo de pré-tratamento pode ser realizado na presença e na ausência de um catalisador, sendo que o processo realizado na ausência de catalisador é comumente denominado autohidrólise (AH). Nesta estratégia, a eficácia do pré-tratamento depende da interação entre alguns fatores primários como a temperatura, o tempo de exposição do material no reator e o teor de umidade da biomassa. Já para o pré-tratamento realizado na presença de catalisador ácido, além dos fatores descritos acima para a autohidrólise, o tipo de catalisador e a quantidade utilizada podem interferir diretamente no rendimento e na acessibilidade dos substratos produzidos.

A escolha da condição de pré-tratamento em experimentos de autohidrólise (temperatura, tempo de exposição e umidade) interfere diretamente no rendimento de recuperação dos principais componentes da biomassa (celulose, hemiceluloses e lignina), bem como na eficiência das etapas de sacarificação da celulose e de fermentação dos hidrolisados obtidos. Os maiores percentuais de sacarificação da celulose são, geralmente, derivados de condições mais drásticas de temperatura e tempo de exposição no reator. No entanto, níveis elevados de decomposição dos carboidratos

(celulose e hemiceluloses) e de condensação da lignina são obtidos sob estas condições, diminuindo o rendimento de recuperação desses componentes e promovendo o acúmulo de inibidores no meio de reação (PITARELO *et al.*, 2012).



(1) Sinapaldeído (R = OCH₃) ou coniferaldeído (R = H); (2) álcool coniferílico (R = OCH₃) ou álcool sinapílico (R = H); (3) guaiacol; (4) siringaresinol; (5) siringaldeído (R = OCH₃) ou vanilina (R = H); (6) álcool siringílico (R = OCH₃) ou álcool vanílico (R = H); (7) ácido siringílico (R = OCH₃) ou ácido vanílico (R = H); (8) siringilglicerol (R = OCH₃) ou guaiacilglicerol (R = H); (9) γ-metoxi-siringil (R = OCH₃) ou γ-metoxi-guaiacil (R = H).

FIGURA 8. COMPOSTOS FENÓLICOS DECORRENTES DA DEGRADAÇÃO DA LIGNINA APÓS AO PRÉ-TRATAMENTO POR EXPLOSÃO A VAPOR.

TABELA 1. MATÉRIAS-PRIMAS E CONDIÇÕES UTILIZADAS PARA O PRÉ-TRATAMENTO POR EXPLOSÃO A VAPOR DE DIFERENTES MATERIAS LIGNOCELULÓSICOS.

Materiais	Catalisador	T (°C) ¹	t (min) ¹	Referência
Palha de trigo	0,1% NaOH	180	20	Montane <i>et al.</i> , 1995
	0,2% H ₂ SO ₄	190	10	Galbe <i>et al.</i> , 2002
	1-15% H ₂ SO ₄	180	2	Chen <i>et al.</i> , 2011
Bagaço de cana	AH	200	4	Dekker <i>et al.</i> , 1983
	AH	188-230	0,5-44	Kaar <i>et al.</i> , 1998
	AH	205	10	Martín <i>et al.</i> , 2008
	AH	200-243	5	Sasaki <i>et al.</i> , 2012
	AH	190	15	Rocha <i>et al.</i> , 2012
	AH	200	7	Wanderley <i>et al.</i> , 2013
	1% H ₂ SO ₄	220	0,5	Morjanoff <i>et al.</i> , 1987
	H ₂ SO ₄	118-222	4,1-59	Mattos <i>et al.</i> , 2001
	SO ₂	180-205	5-10	Galbe <i>et al.</i> , 2002
	H ₃ PO ₄	195-210	4-8	Pitarelo <i>et al.</i> , 2010
Palha de cana	AH	180-200	15	Oliveira <i>et al.</i> , 2013
	AH	200	15	Miléo <i>et al.</i> , 2011
	H ₃ PO ₄	180-210	5-10	Szczerbowski, 2011
<i>Picea albis</i>	0,5-1% H ₂ SO ₄	190-200	2-5	Galbe <i>et al.</i> , 2002
	2,5% SO ₂	190-200	2-5	Galbe <i>et al.</i> , 2002
<i>Salix caprea</i>	AH	195-210	10-14	Galbe <i>et al.</i> , 2002
Palha de milho	3% SO ₂	190-200	5	Öhgren <i>et al.</i> , 2005
	AH	190-220	3-5	Datar <i>et al.</i> , 2006
	H ₂ SO ₄	180-210	1-3	Datar <i>et al.</i> , 2006
<i>Eucalyptus grandis</i>	AH	220-240	2	Ramos <i>et al.</i> , 1991
	1-2,5% SO ₂	210	0,8-2,5	Ramos <i>et al.</i> , 1992
	H ₂ SO ₄	200-210	2-5	Emmel <i>et al.</i> , 2002
<i>Populus tremuloides</i> (álamo)	AH	190-240	0,3-100	Brownell <i>et al.</i> , 1987
	1,6% SO ₂	210-227	2	Mackie <i>et al.</i> , 1985
	H ₂ SO ₄	217-225	2	Excoffier <i>et al.</i> , 1991

¹ T: temperatura; t: tempo; AH: autohidrólise.

A impregnação de materiais lignocelulósicos com ácidos minerais, antes do pré-tratamento por explosão a vapor, tem sido proposta como alternativa para produzir substratos de maior área superficial, devido, particularmente, aos maiores índices de

remoção de hemiceluloses e lignina (MICHALOWCZ *et al.*, 1991; GALBE e ZACCHI, 2002; SÖDERSTRÖM *et al.*, 2002; RUIZ *et al.*, 2008; BALAT *et al.*, 2008; SASSER *et al.*, 2008). Além disto, catalisadores ácidos reduzem o tempo e a temperatura necessários para garantir um bom desempenho ao processo. Neste sentido, muitas pesquisas vêm sendo realizadas para otimizar o uso de ácidos minerais durante o processo de explosão a vapor, já que, em condições mais drásticas, a perda de rendimento e a geração de inibidores das etapas subseqüentes aumenta, enquanto que, em condições mais suaves, o desempenho do substrato na etapa de hidrólise enzimática é parcialmente comprometido (OLSSON, *et al.*, 2005).

O pré-tratamento por explosão a vapor tem sido aplicado com sucesso para produção de etanol a partir de vários materiais lignocelulósicos, como mostra a **TABELA 1**. Os resultados disponíveis na literatura demonstram que este processo remove em torno de 75-90% da hemiceluloses dependendo do substrato e da condição de pré-tratamento. A remoção deste componente durante o pré-tratamento favorece o acesso das enzimas à celulose (EKLUND *et al.*, 1995; OHGREN *et al.*, 2007; ZHU *et al.*, 2008).

1.2.2. Hidrólise Enzimática de Materiais Lignocelulósicos

A hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos é um processo relativamente lento, pois a acessibilidade da celulose é dificultada por barreiras estruturais como o teor de lignina e hemiceluloses e a cristalinidade da celulose (VAN DYK e PLETSCHEKE, 2012; BALAT *et al.*, 2008; TAHERZADEH e KARIMI, 2007; PAN *et al.*, 2006; SUN e CHENG, 2002; GALBE e ZACCHI, 2002; LEE, 1997). A hidrólise de matérias lignocelulósicos *in natura* geralmente resulta na solubilização de apenas 20% da glucose presente inicialmente no material (ZHANG e LYND, 2004). Entretanto, a hidrólise enzimática apresenta algumas vantagens em comparação com a hidrólise com ácido mineral diluído, tais como maiores rendimentos de glucose sem a geração de produtos de degradação (furfural e hidrometilfurfural), baixo custo operacional, condições suaves de reação (45-50 °C e pH 4,8) e não apresenta problemas de corrosão nos equipamentos (SOARES *et al.*, 2011; CASTRO e PEREIRA JR., 2010; SUKUMARAN *et al.*, 2009; ZHU *et al.*, 2008; CARA *et al.*, 2006).

Em sua estrutura supramolecular, a celulose apresenta regiões altamente ordenadas, estabilizadas por numerosas ligações de hidrogênio intra- e intermoleculares, e áreas menos ordenadas ou amorfas, onde as cadeias apresentam uma orientação randomizada (FAN *et al.*, 1987; FONTANA *et al.*, 2004; ATALLA *et al.*, 1993). Vários autores têm sugerido que a celulose amorfa, devido a sua maior área superficial, é mais suscetível à hidrólise enzimática do que a forma ordenada ou cristalina. No entanto,

complexos enzimáticos produzidos por vários tipos de microrganismos têm se demonstrado capazes de catalisar a hidrólise de celulose, tanto cristalina quanto amorfa, em açúcares solúveis de baixa massa molar como a glucose e a celobiose (MEDVE, 1998; CARRASCO, 1992; CONVERSE e WARE, 1994; CHANDRA *et al.*, 2007).

Em face desta heterogeneidade, a sacarificação enzimática de materiais lignocelulósicos depende de uma multiplicidade de atividades específicas complementares, essenciais para que todo o carboidrato nela disponível seja hidrolisado. O mecanismo amplamente aceito para hidrólise enzimática da celulose envolve ações complementares entre endoglucanases (EnG) (endo)-1,4-β-glucanases (EC 3.2.1.4), exoglucanases (ExG) (celobiohidrolases) (EC 3.2.1.91 e EC 3.2.1.176) e β-glucosidases (BGD) (EC 3.2.1.21) (**FIGURA 9**) (VAN DYK e PLETSCHKE, 2012; WILSON, 2011; GRAY E ZHAO, 2006; ZHANG e LYND, 2004; LYND *et al.*, 2002).

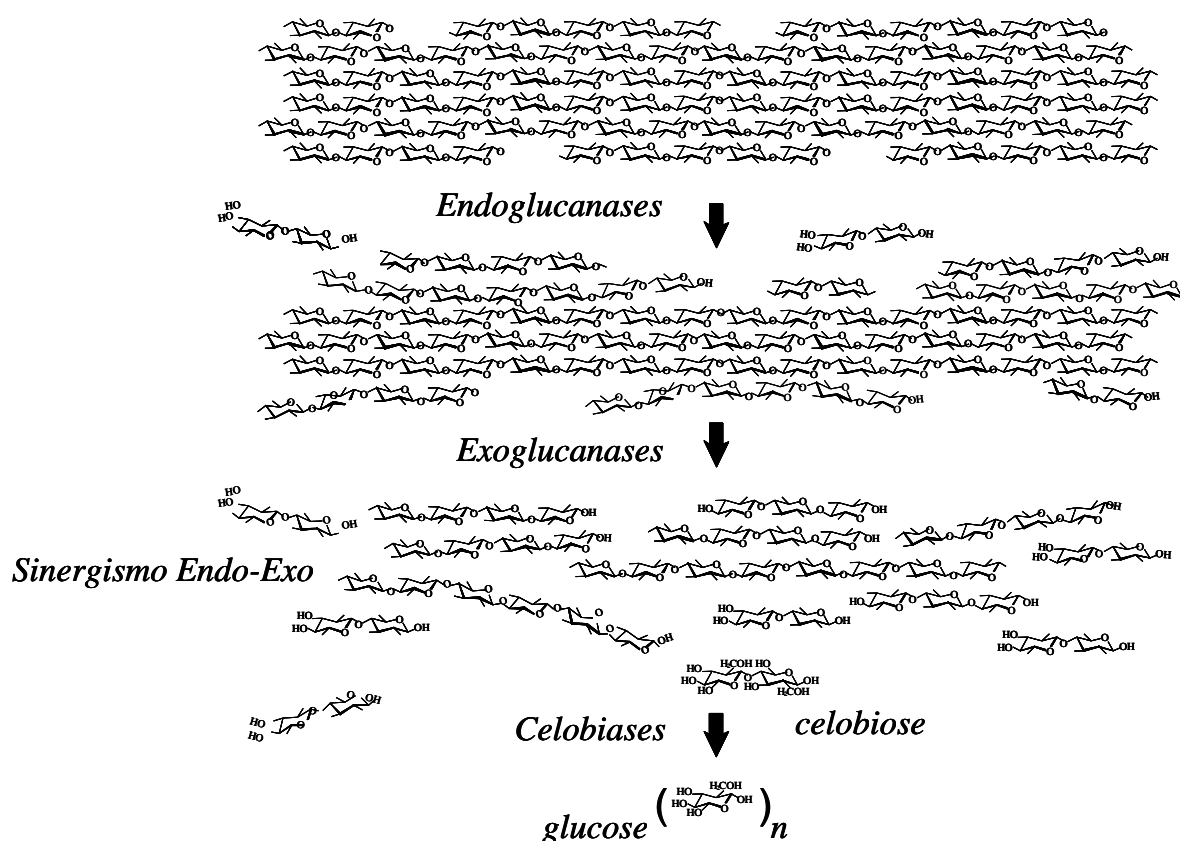


FIGURA 9. MODO DE AÇÃO DO COMPLEXO CELULÁSICO DE *T. reesei* (RAMOS *et al.*, 2004)

As endoglucanases desempenham um papel importante na hidrólise da celulose, atuando aleatoriamente ao longo da molécula de celulose, gerando um decréscimo significativo de seu grau de polimerização e produzindo novas extremidades terminais

redutoras e não redutoras. A ação das endoglucanases ao longo da cadeia de celulose é atribuída ao seu sítio catalítico, que apresenta forma de fenda que, sendo mais aberto que os das celobiohidrolases permite o ataque desta enzima a qualquer ponto ao longo da cadeia de celulose (TEERI, 1997). Por sua vez, as celobiohidrolases (exoglucanases), cujo sítio catalítico é na forma de túnel, atuam nas regiões terminais redutoras e não redutoras das moléculas de celulose, promovendo a sua despolimerização gradativa através da remoção de unidades de celobiose terminais. Finalmente, as β -glucosidases hidrolizam celobiose a glucose, reduzindo assim o efeito inibidor da celobiose sobre as endo- e exoglucanases (ZHANG *et al.*, 2006; OYEKOLA, 2004; HEILINHEIMO, 2002; RAMOS *et al.*, 1993). Entretanto, apenas as endo e exoglucanases são capazes de adsorver sobre o substrato, sendo assim consideradas como celulases verdadeiras (KLYSOV, 2000).

Segundo Bon *et al.* (2008), uma única enzima do complexo celulolítico seria incapaz de hidrolisar a celulose de maneira eficiente, sendo necessária a ação complementar e sinérgica do complexo celulolítico e das β -glucosidases. A sinergia depende das atividades específicas das enzimas envolvidas no processo (NIDETZKY *et al.*, 1993); porém, a intensidade desta também depende da característica do substrato a ser hidrolisado. Nidetzky *et al.* (1993) demonstraram que a ação sinérgica de celulases purificadas de *T. reesei* diminui com o aumento da concentração do substrato e que tal efeito depende fortemente do tipo de celulose testado, sendo máximo para a celulose microcristalina. Foi também comprovado que a atividade destas celulases purificadas aumentava quando substratos “amorfos” eram utilizados, e que as combinações binárias de CBH I/EnG III e CBH I/CBH II exibiram os mais notáveis graus de sinergismo sobre a celulose microcristalina.

A hidrólise enzimática ocorre em três etapas: primeiramente, as enzimas adsorvem sobre a superfície da celulose, depois promovem a hidrólise da ligação glicosídica e, por fim, desorvem da superfície retornando à solução. A capacidade das celulases de adsorver na superfície da celulose é uma importante característica, pois, para que ocorra a hidrólise da celulose, é necessária a interação efetiva entre o substrato insolúvel e a enzima solúvel. A adsorção ocorre nas regiões NH_2 e COOH terminal da enzima, estando separado do domínio catalítico por segmentos ricos em prolina, treonina e serina (WILSON, 2011; LINDER e TEEREI, 1997). A remoção do módulo de ligação ao carboidrato (CBM) reduz sua eficiência hidrolítica sobre a celulose cristalina, mas não afeta a sua atividade sobre a celulose amorfa (HILDÉN e JOHANSSON, 2004; GRAY e ZHAO, 2006).

O mecanismo de hidrólise enzimática das ligações glicosídicas pode ocorrer por dois mecanismos principais de substituição nucleofílica de segunda ordem ($\text{S}_{\text{N}}2$) (MELO

e CARVALHO, 2006). Tais mecanismos levam à inversão ou não da configuração anomérica da glucose. No mecanismo que leva à inversão de configuração (**FIGURA 10A**), um dos resíduos de ácido carboxílico doa um próton para o oxigênio da ligação glicosídica, enquanto que a molécula de água atua como nucleófilo e ataca o carbono 1 (C1); já o outro resíduo de ácido carboxílico abstrai um próton da molécula de água, ficando protonado e formando assim um intermediário no qual o carbono 1 fica carregado positivamente, levando assim à quebra da ligação devido a sua baixa densidade eletrônica (KOSHLAND, 1953).

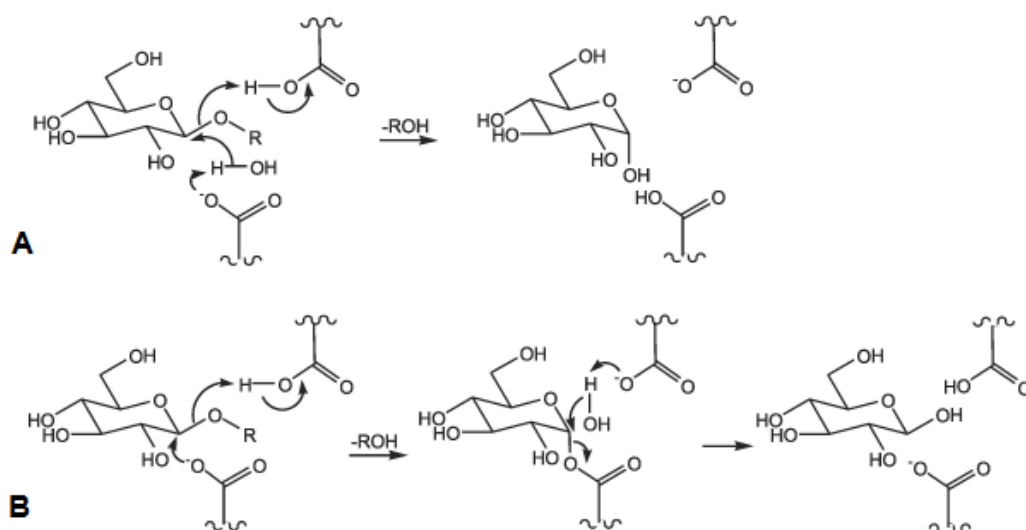


FIGURA 10. REPRESENTAÇÃO SIMPLIFICADA DA HIDRÓLISE DAS LIGAÇÕES GLICOSÍDICAS DO TIPO β -(1→4): **(A)** INVERSÃO DE CONFIGURAÇÃO E **(B)** RETENÇÃO DE CONFIGURAÇÃO (MELO e CARVALHO, 2006).

No mecanismo de retenção da configuração (**FIGURA 10B**), diferentemente do mecanismo de inversão, um dos resíduos de ácido carboxílico age como base e ácido e o outro como nucleófilo (MELO e CARVALHO, 2006). Na primeira etapa ocorre o ataque nucleofílico de um dos resíduos de ácido carboxílico no C1, o qual fica carregado positivamente, enquanto que o oxigênio da ligação β -(1→4) ataca o próton do outro resíduo de ácido carboxílico, formando assim o intermediário enzima-carboidrato. Na segunda etapa, a água ataca o centro anomérico enquanto que o resíduo de ácido desprotonado retira um próton da água, formando um estado de transição em que C1 fica positivamente carregado e, assim, a ligação enzima-carboidrato se desfaz, liberando o açúcar redutor (KOSHLAND, 1953).

Estudos têm sido realizados na busca de preparações enzimáticas capazes de hidrolisar a celulose de maneira cada vez mais efetiva, seja pela combinação de enzimas

para a obtenção de complexos celulásicos mais eficientes ou pelo melhoramento destes complexos por métodos de engenharia genética (JØRGENSEN *et al.*, 2005; IMAI *et al.*, 2004; KADAM *et al.*, 2004).

Vários fatores podem influenciar a hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos e estes podem ser associados à característica do substrato e ao comportamento das enzimas durante a sacarificação. Dentre os fatores relacionados ao substrato, vale citar alterações em sua porosidade e área superficial durante a hidrólise (SUN *et al.*, 2009; MAMERS *et al.*, 1981; MANSFIELD *et al.*, 1999), o acúmulo de lignina no meio reacional (para substratos ricos em lignina) (PAN *et al.*, 2004; ADSUL *et al.*, 2005; SCHEWCHENKO *et al.*, 1999; MOONEY *et al.*, 1999) e mudanças no grau de polimerização e na cristalinidade da celulose (FAN *et al.*, 1987; MARTÍN *et al.*, 2007; RAMOS *et al.*, 1992). Já os fatores associados às enzimas correspondem à inibição retroativa devida ao acúmulo dos produtos de hidrólise (glucose e celobiose) no meio reacional (LASER *et al.*, 2002; PALMQVIST *et al.*, 1996; KADAM *et al.*, 2004; CANTARELLA *et al.*, 2004), à desnaturação térmica das enzimas em reações usualmente muito longas e o efeito da agitação mecânica (cisalhamento) sobre a atividade enzimática (RAMOS e SADDLER, 1994; TENGBORG *et al.*, 2001; LAUREANO-PEREZ *et al.*, 2005) e à adsorção irreversível das enzimas sobre a lignina e/ou complexos lignina-carboidrato (TENGBORG *et al.*, 2001; LU *et al.*, 2002; PALONEN *et al.*, 2004).

As enzimas podem se ligar à superfície dos substratos por interações específicas ou não-específicas. Estas interações não são covalentes e ocorrem por ligações de hidrogênio, por atração eletrostática ou por interação hidrofóbica (PALONEN, 1995). A atração eletrostática contribui para a interação substrato-enzima, mas a intensidade deste fenômeno depende das condições do ensaio (temperatura e pH) (NORDE e HAYNES, 1995). Por outro lado, a hidrofiliidade da superfície tem um efeito considerável sobre o mecanismo e a taxa de adsorção: geralmente, quanto mais hidrofóbica for a superfície, maior será o grau de adsorção. Entretanto, a presença destes grupos hidrofóbicos pode intensificar interações não-específicas com a lignina, diminuindo a disponibilidade destas para a sacarificação da celulose ou eventualmente ocasionando a sua inativação (PALONEN *et al.*, 2004; CONVERSE *et al.*, 1998; SUN e CHANG, 2002). Uma maneira de minimizar este efeito é a deslignificação do material antes da hidrólise enzimática, sendo que a forma mais clássica é a extração alcalina (HERNÁNDEZ-SALAS *et al.*, 2009), podendo esta ser suplementada, por exemplo, com peróxido de hidrogênio para aumentar o rendimento da extração (CARA *et al.*, 2006). No entanto, existem problemas adicionais a este processo, como o custo e a geração de passivos ambientes, principalmente pelo consumo de água e produção de efluentes que necessitam de

tratamento. A deslignificação também pode ser realizada utilizando enzimas como lignina peroxidases, manganês peroxidases e lacases, que podem ser encontradas em fungos (RODRIGUES *et al.*, 2008; SCHILLING *et al.*, 2009). A principal desvantagem da deslignificação biológica é o tempo necessário para que ocorra a total remoção da lignina (10-14 dias) (CHANDRA *et al.*, 2007).

A relação entre a concentração de substrato e a carga enzimática empregada no processo de sacarificação afeta a produtividade e a taxa inicial de hidrólise. Segundo alguns autores, a alta concentração de substrato no meio de reação dificulta os fenômenos de transferência de massas, como também aumenta a concentração dos produtos de hidrólise no meio (celobiose e glucose), interferindo diretamente na eficiência do processo de sacarificação (PENNER e LIAW, 1994, SUN e CHENG 2002). Penner e Liaw (1994) relataram que a concentração ótima de substrato foi de 1,25 g de substrato por FPU (unidades de papel de filtro) em experimentos utilizando celulose microcristalina (Avicel PH 105) e o complexo celulásico de *T. reesei*. As características estruturais da celulose também podem interferir na ação do complexo de enzimas celulolíticas. A cristalinidade está relacionada com a reatividade do substrato e, segundo Zhang e Lynd (2004), pode inclusive aumentar com a diminuição do grau de polimerização da celulose. Este processo, denominado recristalização, é mais evidente quando materiais celulósicos são desidratados (e.g., mediante secagem ou liofilização a partir de uma suspensão aquosa), o que diminui a acessibilidade e, por conseguinte, a suscetibilidade da celulose à hidrólise enzimática.

A inibição das celulasas pelos seus produtos de reação é relatada na literatura como um dos principais fatores para o comprometimento do processo de sacarificação. Vários trabalhos (CHAN *et al.*, 1989; BREUIL *et al.*, 1993; RAMOS *et al.*, 1993; BOMMARIUS *et al.*, 2008) demonstraram que níveis elevados de atividade β -glucosidásica são eficazes na redução dos efeitos inibitórios causados pelo acúmulo de celobiose no meio e, conseqüentemente, no aumento da eficiência do processo de hidrólise. Holtzaple *et al.* (1990) mostraram que as exoglucanases são muito sensíveis ao aumento da concentração de celobiose, enquanto que β -glucosidases são fortemente inibidas por altas concentrações de glucose. No entanto, a diminuição da atividade enzimática devido ao acúmulo de glucose foi praticamente insignificante quando comparada com o de celobiose. Outros estudos também demonstraram que tanto a glucose como a celobiose podem agir como inibidores das celulasas de *T. ressei* (BEZERRA e DIAS, 2005; GRUNO *et al.*, 2004, XIAO *et al.*, 2004; KADAM *et al.*, 2004; HOLTZAPPLE *et al.*, 1990). Xiao *et al.* (2004) provaram que as celulasas de *T. reesei* são mais sensíveis à inibição por celobiose, xilose, manose e galactose que as β -glucosidases (*Aspergillus niger*). Além disso, o acúmulo de açúcares solúveis (glucose e

celobiose) no meio reacional pode influenciar a adsorção das celulasas ao substrato (TANAKA *et al.*, 1986).

Vários métodos têm sido propostos para minimizar o efeito inibitório dos produtos de reação sobre o modo de ação das celulasas, incluindo o uso de concentrações mais elevadas de enzimas, a suplementação com β -glucosidases e a remoção de açúcares durante a hidrólise enzimática, quer por sacarificação e fermentação simultâneas (SSF) ou por ultrafiltração, quando a sacarificação e a fermentação são realizadas em separado (SHF) (ZHENG *et al.*, 1998; SUN e CHENG, 2002).

As condições experimentais também podem interferir na taxa de sacarificação da celulose, tais como a temperatura, o pH e a agitação do meio de reação. Neste sentido, as celulasas também sofrem modificações no seu desempenho quando submetidas a diferentes condições de pH, temperatura e pressão. Estas condições já foram otimizadas em 45-50°C e pH 4,8 para o complexo celulásico de *T. reesei* (SUN, 2002). Porém, outros microrganismos poderão exigir outras condições para maximizar o seu desempenho.

Como a presença de hemiceluloses e lignina tornam o acesso das enzimas à celulose mais difícil, faz-se necessário o emprego de um processo de pré-tratamento para removê-las e/ou alterá-las quimicamente, de modo a favorecer a hidrólise por mecanismos que incluem a redução da cristalinidade e o aumento de sua porosidade (ROMANI *et al.*, 2010; VARNAL *et al.*, 2010; GALBE e ZACCHI, 2002; RAMOS, 2003). Neste sentido, o pré-tratamento deve ser muito eficiente em termos de rendimento e seletividade para garantir maior acessibilidade das enzimas à celulose, fornecendo simplicidade operacional, segurança industrial, além de atributos ambientais como consumo reduzido de insumos químicos e energia. Paralelamente, o pré-tratamento ideal ainda tem que garantir uma recuperação maximizada das hemiceluloses e minimizar a geração de compostos inibidores utilizados nas etapas de hidrólise e de fermentação (VAN DYK e PLETSCHE, 2012).

Como descrito acima, a lignina representa uma barreira para a degradação enzimática da celulose. A capacidade da lignina de atuar como barreira à degradação pode ser atribuída a sua estrutura polimérica tridimensional e amorfa (WENG *et al.*, 2008). Estudos comprovam que mudanças na estrutura da lignina afetam a hidrólise enzimática mais do que a quantidade de lignina presente no substrato. Palonen *et al.* (2004) demonstraram que a oxidação da lignina por tratamento com lacases produz um aumento no rendimento da hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos.

Como dito anteriormente, os pré-tratamentos que utilizam ácidos concentrados ou diluídos podem formar alguns inibidores importantes, como, por exemplo, furfural, hidroximetilfurfural e compostos fenólicos, que são oriundos da desidratação de pentoses

e hexoses e da hidrólise e modificação química da lignina durante o processo, respectivamente. Apesar de que a maior parte destes inibidores possa ser eliminada do material fibroso por simples lavagem aquosa após o pré-tratamento, parte ainda permanece no interior das fibras devido a sua baixa solubilidade em água ou por mera ineficiência do procedimento de lavagem que, naturalmente, sofre com problemas relacionados à transferência de massas em direção à fase líquida. Durante a hidrólise, compostos inibidores como estes podem ser liberados no meio reacional, aumentando o impacto de fatores que levam à perda de eficiência na sacarificação (MOSIER *et al.*, 2005; TENGBORD *et al.*, 2001; PALMQVIST *et al.*, 1996)

A natureza e concentração de inibidores potenciais do processo de sacarificação variam de acordo com o tipo de material lignocelulósico utilizado e com as condições de pré-tratamento empregado (PALMQVIST *et al.*, 1996; McMILLAN, 1994). Segundo Palonen *et al.* (2004), a inibição das enzimas envolvidas na sacarificação de materiais lignocelulósicos pré-tratados a vapor está em grande parte associada as interações hidrofóbicas não específicas entre a lignina e o domínio de ligação da enzima à celulose. Entretanto, outros autores preferem argumentar que as hemiceluloses, ligadas ou não à lignina, formam uma barreira física ao redor do material celulósico que diminui a afinidade da enzima pelo seu principal substrato, ou seja, a celulose (HU, 1996; SCHEWCHENKO *et al.*, 1999).

Estudos realizados para determinar o efeito de compostos fenólicos, presentes em resíduos das sementes de girassol, sobre a atividade celulásica das enzimas de *T. reesei*, demonstraram que o ácido clorogênico, testado em concentrações que variaram de 1,20 a 4,50 mmol.L⁻¹, apresentou menor capacidade inibitória do que os ácidos caféico (0,22-0,70 mmol.L⁻¹), ferúlico (0,58-2,00 mmol.L⁻¹) e sinápico (0,83-1,64 mmol.L⁻¹). Nestas concentrações, a inibição causada pelos ácidos sinápico e ferúlico foi de 100 e 10 vezes maior que do ácido clorogênico, respectivamente (SINEIRO *et al.*, 1997). Já o ácido sinápico apresentou um poder inibitório 1000 vezes maior do que a celobiose (SINEIRO *et al.*, 1997; HOLTZAPPLE *et al.* 1990).

A hidrólise enzimática de madeira de álamo, pré-tratada por explosão a vapor a 20-50 bar e 210-260°C na presença de 0,5% H₂SO₄, foi fortemente afetada por fenóis solúveis em água. O rendimento da hidrólise da celulose por celulasas de *T. reesei* foi reduzido em até 24% na presença de fenóis, que também interferiu na adsorção e/ou inativação de endo-1,4-β-glucanases (EXCOFFIER *et al.*, 1991). Mes-Hartree *et al.* (1988) estudaram o efeito de inibidores produzidos no pré-tratamento por explosão a vapor (250°C por 20 s) da palha de trigo e de madeira de álamo sobre a hidrólise enzimática de celulose usando celulasas de *T. harzianum*, e concluíram que os

resultados só foram eficientes após a remoção dos compostos de baixa massa molar, através da lavagem dos substratos com água.

Hodge *et al.* (2008) estudaram o efeito de alguns inibidores sobre a hidrólise enzimática da palha de milho pré-tratada com ácido sulfúrico diluído. Os experimentos foram realizados utilizando um percentual de 5-13% de componentes insolúveis e carga enzimática variando de 12-40 mg de proteína.g⁻¹ de celulose. Os inibidores estudados foram ácido acético, vanilina, siringaldeído, ácido 4-hidroxicinâmico, furfural e hidroximetilfurfural. A presença de ácido acético (15 g.L⁻¹), compostos fenólicos (9 g.L⁻¹) e furanos (8 g.L⁻¹) causou pouca inibição no processo de hidrólise enzimática e o principal fator inibitório foi alta concentração de açúcares. Quando a hidrólise enzimática foi realizada diretamente no produto do pré-tratamento sem lavagem aquosa, empregando altas cargas enzimáticas de 52 mg de proteína.g⁻¹ de celulose, houve a conversão de 70 % da celulose em 92 h de reação. Entretanto, quando utilizado uma carga enzimática menor (17 mg de proteína.g⁻¹ de celulose), a conversão da celulose foi de apenas 50% no mesmo tempo de reação (92 h). A presença de ácido acético (15 g.L⁻¹) diminuiu a conversão da celulose em aproximadamente 10%, sendo que altas concentrações de ácido acético também podem servir de inibidores para leveduras e bactérias (DELGENES *et al.*, 1996; PALMQVIST *et al.*, 1999; ZALDIVAR *et al.*, 1999). Cantarella *et al.* (2004) demonstraram que não houve inibição de celulasas com cargas de 120 mg de proteínas.g⁻¹ de celulose na presença de 2 g.L⁻¹ de ácido acético. Do mesmo modo, furanos e compostos fenólicos não proporcionaram inibição considerável da hidrólise enzimática nos ensaios realizados por estes autores.

1.2.3. Fermentação

O microorganismo comumente utilizado no processo de fermentação alcoólica é a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Este microorganismo converte facilmente a glucose em etanol e gás carbônico (CO₂) e apresenta alta tolerância ao etanol em comparação com outras leveduras (SANTOS *et al.*, 2010; SÁNCHEZ e CARDONA, 2008). Entretanto, *S. cerevisiae* é incapaz de assimilar ou de fermentar pentoses como a xilose, o principal constituinte da fração hemicelulósica da biomassa.

Diversos fatores podem afetar o rendimento em etanol durante a fermentação, tais como a temperatura, a concentração de nutrientes, a presença de inibidores e o tipo de microorganismo fermentador. Para as leveduras, a concentração do inóculo, a espécie e sua linhagem afetam diretamente o desempenho do processo fermentativo, sendo que o emprego de maiores concentrações de inóculo permite a realização de fermentações

mais rápidas, com maior produtividade em etanol e menor contaminação por bactérias (LIMA *et al.*, 2001).

A utilização de *S. cerevisiae* para a produção de etanol celulósico pode ser comprometida pelos inibidores formados durante o processo de pré-tratamento (SÁNCHEZ e CARDONA, 2008). Geralmente, esses inibidores são compostos hidrossolúveis de baixa massa molar, como o ácido acético (vindo da desacetilação das hemiceluloses), produtos de desidratação de açúcares (furfural e hidroximetilfurfural) e produtos de degradação da lignina (compostos fenólicos), sendo que a concentração desses compostos varia com as condições de pré-tratamento e com o tipo de matéria-prima empregada.

Ando *et al.* (1986) estudaram o efeito inibitório dos produtos de degradação da lignina, após o pré-tratamento por explosão a vapor de madeira de álamo a 205°C por 10 min, sobre a fermentação de glucose a etanol utilizando *S. cerevisiae*. Os resultados mostraram que o siringaldeído e os ácidos 3-hidroxibenzóico e siríngico, em concentrações de até 0,1% (m.m⁻¹ seca de madeira pré-tratada), não afetaram a eficiência da fermentação. A vanilina apresentou inibição moderada e esta foi maior do que a do *p*-hidroxibenzaldeído. Já o ácido cinâmico e o cinamalaldeído inibiram completamente a fermentação.

Estudos de fermentação por hidrólise e fermentação em separado (*SHF*) e sacarificação e fermentação simultâneas (*SSF*) foram realizados para a palha de milho pré-tratada por explosão a vapor a 190°C por 5 min, empregando 3% de SO₂ como catalisador (OHGREN *et al.*, 2007). Os experimentos foram realizados com o material sem lavar e lavado com água após o pré-tratamento, utilizando uma concentração de 8% de sólidos totais, 10 FPU.g⁻¹ em relação aos sólidos totais de uma mistura de enzimas comerciais (celulase NS 50013 suplementada com 25% da β -glucosidase Novozym 188) e a levedura *S. cerevisiae* Tembec I (1 g.L⁻¹ de levedura seca). Para os substratos não lavados, o rendimento em etanol no processo *SSF* foi maior em relação ao *SHF* em 120 h de reação, produzindo 20,5 g.L⁻¹ e 16,8 g.L⁻¹, respectivamente. Já para os substratos lavados, o rendimento em etanol foi de 19,4 g.L⁻¹ para *SHF* e de 18,2 g.L⁻¹ para o *SSF* em 120 h de reação. Segundo os autores, os inibidores presentes na fração solúvel após o pré-tratamento tiveram um impacto significativo sobre a hidrólise enzimática e esse impacto negativo diminuiu quando a hidrólise e a fermentação foram realizadas ao mesmo tempo (processo *SSF*) (OHGREN *et al.*, 2007).

Muitos trabalhos relatam que a formação de furfural e hidroximetilfurfural por desidratação das pentoses e hexoses, durante o processo de pré-tratamento, inibe a ação dos microrganismos fermentativos, principalmente em processos que utilizam ácido mineral diluído (LIU *et al.*, 2004). Estes inibidores danificam as paredes e membranas

celulares, inibem o crescimento celular, reduzem atividades enzimáticas, causam danos ao DNA, inibem a síntese de proteínas e RNA e, por conseguinte, reduzem a produção de etanol (VAN MARIS *et al.*, 2006; LIU *et al.*, 2009). Para tornar viável a produção de etanol celulósico, estudos têm sido orientados à identificação de linhagens que sejam resistentes a inibidores gerados durante o pré-tratamento.

1.3. Pré-tratamento de Bagaço de Cana na Presença de Ácido Fosfórico (H_3PO_4)

A utilização de soluções diluídas ácido fosfórico tem mostrado resultados promissores para o tratamento de biomassa (DESCHAMPS *et al.*, 1996; FONTANA *et al.*, 2001; GÁMEZ *et al.*, 2006; GEDDES *et al.*, 2010, 2011; NIEVES *et al.*, 2011; AVCI *et al.*, 2013; VASCONCELOS *et al.*, 2013). Os resultados disponíveis na literatura tem demonstrado que os tratamentos realizados a temperaturas baixas, longos tempos de reação e altas concentrações de ácido fosfórico (2-6% m.m⁻¹) são eficientes na remoção das hemiceluloses e, por consequência, produzem substratos mais acessíveis às enzimas (VASCONCELOS *et al.*, 2013). Entretanto, o ácido fosfórico é aproximadamente 20% mais caro que o ácido sulfúrico e por isso o ácido sulfúrico é mais amplamente empregado no tratamento de materiais lignocelulósicos.

Estudos recentes, utilizando bagaço de cana contendo menores concentrações de ácido fosfórico (1% m.m⁻¹), mostraram que o tratamento a vapor por 10 min em temperaturas que variaram de 140 a 190°C foi eficiente na remoção das hemiceluloses (76%) e na produção de etanol (77-91%) quando os experimentos foram realizados em temperaturas inferiores a 180°C (GEDDES *et al.*, 2010). Estes autores também compararam a produção de açúcares totais utilizando o ácido sulfúrico e o ácido fosfórico a 1% (m.m⁻¹) (145°C, 1 h, 12% de bagaço). Os resultados obtidos foram semelhantes para ambos os ácidos, produzindo 257±10 e 246±13 g de açúcar.kg⁻¹ de bagaço seco, respectivamente. Entretanto, uma maior concentração de glucose, de produtos de desidração (furfural e HMF) e de ácidos orgânicos (ácido levulínico e ácido fórmico) foram detectados no hidrolisado obtidos com ácido sulfúrico.

Geddes *et al.* (2011) investigaram a produção de etanol celulósico (hexoses e pentoses) a partir do bagaço de cana pré-tratado por vapor (160-190°C; 10 min, 0,01 g H₃PO₄.g⁻¹ de bagaço seco) pelo processo de sacarificação e cofermentação simultâneas (SSCF). Os ensaios de sacarificação foram realizados com a enzima Kerry Biocellulase W (5 FPU.g⁻¹ de substrato seco) suplementada com Novozym 188 (2,77 UCB.g⁻¹ de substrato seco) (UCB, unidades de celobiose: unidade de medida utilizada para expressar a atividade celobiótica total segundo a IUPAC) por um tempo de pré-hidrólise de 6 h a 55°C (250 rpm). Após este tempo, a temperatura foi reajustada para 37°C e já

adicionado ao hidrolisado 50 mL de inóculo de *Escherichia coli* LY180 recombinante (MM160). O maior rendimento em etanol foi de 30 g.L⁻¹, obtido para o substrato pré-tratamento a 180°C e submetido ao processo de SSCF por 122 h e 14% de sólidos totais. Outro estudo, realizado por Nieves e colaboradores (2011) mostrou que a fermentação dos substratos obtidos pelo pré-tratamento do bagaço de cana com ácido fosfórico (180 °C, 10 min, 1% m.m⁻¹) produziu 0,20 g de etanol por g de bagaço utilizando a estirpe *Escherichia coli* engenheirada e detoxificado com metabissulfito de sódio (5 mmol.L⁻¹) pelo processo de SSCF.

Vasconcelos e colaboradores investigaram a influência do tempo de pré-tratamento (8-24 min), da temperatura (144-186°C) e da concentração do ácido fosfórico (0,05-0,20%, m.v⁻¹) sob o tratamento do bagaço de cana em um reator rotativo. O efeito do pré-tratamento foi avaliado em relação à caracterização química da fração sólida e da conversão da celulose em glucose por hidrólise enzimática. A sacarificação da celulose foi realizada com uma mistura de Celluclast 1.5 L (20 FPU.g⁻¹ de bagaço) e Novozym 188 (4 UCB.g⁻¹ de bagaço), sendo que a reação foi realizada a 50 °C e 150 rpm a uma concentração de 2% de substrato por 72 h. Os melhores substratos foram obtidos para os pré-tratamentos realizados 186°C, 0,20% de catalisador por 8 e 24 min. Tais condições removeram 96 e 98% das hemiceluloses presentes no bagaço, respectivamente, e apresentaram conversão de aproximadamente 57% em 72 h de reação. Quantidades relativamente baixas de HMF (0,24 g.L⁻¹) e furfural (0,60 g.L⁻¹) foram detectados nas frações solúveis. Além disso, a concentração de ácido fosfórico remanescente no hidrolisado hemicelulósico foi considerado bom para o fornecimento de fosfato exigido na etapa de fermentação.

O uso de soluções diluídas de ácido fosfórico como catalisador, comparativamente aos procedimentos que utilizam ácidos mais fortes como o ácido sulfúrico, apresenta menor efeito destrutivo sobre as pentoses, com menor acúmulo de furfural no meio de reação (FONTANA *et al.*, 2001; GÁMEZ *et al.*, 2006; GEDDES *et al.*, 2010). Os substratos produzidos a partir dos pré-tratamentos que utilizam ácido sulfúrico também necessitam de alguma forma neutralização após o pré-tratamento. Isto adiciona novos passos ao processo, com implicações inevitáveis nos custos operacionais. Além disso, estes ácidos promovem a corrosão interna dos equipamentos, exigindo a construção de reatores mais resistentes e, portanto, mais caros. Contrariamente, o ácido fosfórico, adicionado ao pré-tratamento na forma de soluções diluídas, além de não necessitar destes cuidados, pode constituir fonte adicional de nutrientes para processos fermentativos, particularmente na forma de fosfato de amônio (DESCHAMPS *et al.*, 1996; GEDDES *et al.*, 2011).

Atualmente, muitos autores investigam a utilização de ácido fosfórico diluído no pré-tratamento de bagaço de cana para a produção de etanol celulósico. Entretanto, dos trabalhos disponíveis na literatura poucos utilizam este ácido associado a outro tipo de pré-tratamento, como, por exemplo, no processo de explosão a vapor. Nesta estratégia, a concentração de ácido fosfórico empregada no pré-tratamento pode ser reduzida, sem afetar a hidrólise das hemiceluloses e a acessibilidade das fibras às enzimas.

1.4. Processos de Produção de Etanol Celulósico

Como dito anteriormente, a produção de etanol celulósico é realizada em quatro etapas sequenciais: o pré-tratamento da biomassa, que visa aumentar a acessibilidade dos carboidratos à conversão; a hidrólise enzimática, que converte os carboidratos em açúcares fermentescíveis; a fermentação, que é responsável pela produção de etanol; e, finalmente, a recuperação do etanol por destilação. Tais etapas podem ser realizadas em unidades independentes, como por exemplo, o processo *SHF* ou de forma integrada, como os processos *SSF*, *CF*, *SSCF* e *CBP* (**FIGURA 5**).

No processo *SHF*, o material lignocelulósico obtido após o pré-tratamento é submetido à hidrólise enzimática por um período que varia de 48 a 96 h. Após a sacarificação da celulose, o hidrolisado resultante é fermentado e convertido a etanol em um reator separado (SANCHEZ e CARDONA, 2008). A principal vantagem deste processo é permitir que os processos de hidrólise enzimática e fermentação ocorram em condições ótimas. Geralmente, a temperatura ótima para ação das enzimas está entre 45 e 50°C e a temperatura ótima para grande parte das leveduras utilizadas na produção de etanol está entre 30 e 37°C (SANTOS *et al.*, 2010). Por outro lado, a principal desvantagem deste processo é relacionada à inibição do complexo celulotítico pelos seus produtos de hidrólise, celobiose e glucose, que se acumulam no meio reacional, gerando rendimentos baixos em função da hidrólise incompleta da celulose (WINGREN *et al.*, 2005). Outra desvantagem do *SHF* é a possibilidade de contaminação. Como a etapa de hidrólise requer tempos muito longos, o hidrolisado rico em açúcares torna-se uma fonte disponível para fermentações secundárias (TAHERZADEH e KARIMI, 2007).

No caso do processo *SSF*, as enzimas e as leveduras são adicionadas ao mesmo tempo no reator, o que reduz o tempo de processamento e a inibição das celulasas pelo acúmulo de seus produtos (celobiose e glucose), uma vez que a glucose liberada por hidrólise é rapidamente convertida a etanol pelos microrganismos da fermentação (WATANABE *et al.*, 2010; SÁNCHEZ e CARDONA, 2008; OLSSON *et al.*, 2006; BALLESTEROS *et al.*, 2004). Além disso, o processo *SSF* é menos complexo e requer menor investimento de capital, quando comparado ao *SHF*, pois reduz o número de

reatores e diminui o risco de contaminação devido à manutenção de baixas concentrações de açúcar livre no meio reacional (VÁSQUEZ *et al.*, 2007). A desvantagem deste processo está associada à diferença entre as temperaturas ótimas para as enzimas hidrolíticas e para os microrganismos de fermentação (BINOD *et al.*, 2010). Entretanto, uma estratégia para superar esta desvantagem é fazer uma etapa de pré-sacarificação, onde o complexo celulolítico é adicionado ao substrato e, após um certo tempo, a temperatura é diminuída e a levedura adicionada ao meio para a produção de etanol (MESA *et al.*, 2011).

A cofermentação (*CF*) de hidrolisados lignocelulósicos consiste na utilização de microrganismos que apresentem capazes de fermentar pentoses e hexoses indistintamente. Como esta habilidade não é comumente encontrada na natureza, a realização deste processo depende da modificação genética de microrganismos hospedeiros, como alguns tipos de leveduras industriais (SCHLITTLER *et al.*, 2012). Alternativamente, a cofermentação pode ser realizada pelo uso simultâneo de dois ou mais microrganismos, capazes de fermentar pentoses ou hexoses individualmente. Por outro lado, os hidrolisados hemicelulósicos, particularmente a xilose, podem ser aproveitados para obtenção de outros produtos de maior valor agregado do que o etanol, principalmente quando a estratégia adotada envolva a integração dos processos de produção de etanol sacarínico (sacarose) e celulósico (celulose) (DIAS *et al.*, 2012). Além disso, a remoção dos hidrolisados hemicelulósicos após o pré-tratamento pode diminuir eventuais efeitos inibitórios sobre as etapas de hidrólise enzimática e fermentação. Atualmente, estudos têm sido orientados ao aproveitamento da xilose para a produção de xilitol (DOMINGUEZ *et al.*, 1997; ALVES *et al.*, 1998; RAO *et al.*, 2006; RODRIGUES *et al.*, 2011; PRAKASH *et al.*, 2011; PING *et al.*, 2013), ácido láctico (GARDE *et al.*, 2002; SAHA, 2003; MAAS *et al.*, 2006) e biogás (PATTRA *et al.*, 2008; KAPARAJU *et al.*, 2009; FANGKUM *et al.*, 2011), dentre outros.

O processo de sacarificação e cofermentação simultâneas (*SSCF*) representa a integração dos processos de *SSF* e de *CF* (CARDONA *et al.*, 2010). Finalmente, a última estratégia, consiste no bioprocesso consolidado (*CBP*) onde a cofermentação (*CF*) e a produção de enzimas são realizadas por um único microorganismo. Entretanto, os processos de *SSCF* e *CBP* são inteiramente dependentes de técnicas genéticas para serem consolidados (SCHLITTLER *et al.*, 2012).

Atualmente, outro processo vem sendo estudado para a produção de etanol celulósico que envolve, a sacarificação, filtração e fermentação simultâneas (*SSFF*). Neste processo, a biomassa pré-tratada é hidrolizada por enzimas em um reator e o hidrolisado produzido é filtrado utilizando uma membrana de fluxo cruzado (*cross-flow membrane*) para o tanque de fermentação. Estudos realizados por Ishola *et al.* (2013)

mostraram que a membrana de filtração tem vida útil de aproximadamente 4 semanas (28 dias), considerando uma hidrólise enzimática de 14,4% de sólidos totais. Nestas condições, o rendimento em etanol foi de 85% em relação ao teórico, utilizando uma estirpe de *S. cerevisiae* (10 g.L⁻¹). O processo *SSFF* permite que as enzimas e os microrganismos de fermentação possam ser utilizados em suas condições ótimas. Além disso, é possível reciclar os microrganismos de fermentação por várias vezes (ISHOLA *et al.*, 2013).

1.5. Cenário Atual da Produção de Etanol Celulósico

A limitação dos recursos fósseis e o impacto das emissões de gases de efeito estufa sobre o clima do planeta, aumentaram o interesse pela utilização de recursos renováveis para a produção de energia, seja para a geração de calor e eletricidade ou mesmo para a produção de combustíveis para o setor de transportes. Neste sentido, a produção de etanol celulósico a partir da biomassa vegetal tem sido foco de muitos estudos nos últimos anos em todo mundo. A soma de esforços entre governos, indústrias e instituições de pesquisa estão voltados para o desenvolvimento de tecnologias que permitam o aproveitamento de diferentes fontes de biomassa vegetal para a produção de etanol celulósico em escala comercial para atender a expansão da demanda deste combustível, sem aumentar a área plantada das culturas tradicionais.

Recentemente, a Administração de Informação de Energia dos Estados Unidos (AIE) lançou um relatório sobre a expansão da produção de etanol celulósico em todo mundo. O relatório foi baseado em um banco de dados que envolve projetos voltados para a produção de biocombustíveis. Tais dados alimentam um mapa interativo que está disponível na página <http://demoplants.bioenergy2020.eu>.

Os dados presentes no relatório da AIE mostram que as tecnologias bioquímicas são mais utilizadas que as termoquímicas. Dos 59 projetos, que os dados foram fornecidos, 61% utilizam via bioquímica, 28% via termoquímica e apenas 10% via química. Os processos de pré-tratamentos mais utilizados incluem o processo de explosão a vapor e o uso de ácidos minerais diluídos. O processo de sacarificação é realizado geralmente por enzimas comerciais. Entretanto, algumas empresas, como a Iogen (Boone, EUA) e Mascoma (Rome, EUA), produzem suas próprias enzimas. A Mascoma combina a produção da enzima, a hidrólise e fermentação em um único passo, em um processo denominado bioprocessamento consolidado (*CBP*).

Uma variedade de materiais lignocelulósicos estão sendo utilizados, tais como resíduos agrícolas, resíduos florestais, resíduos de madeiras, culturas energéticas e resíduos sólidos urbanos, sendo que a palha e o sabugo de milho, a palha de trigo,

lascas de madeira, bagaço de cana e resíduos de polpação de madeira (*sulphite spent liquor*) são as matérias-primas mais utilizadas.

Atualmente, 40 projetos estão operacionais, 6 estão em construção, 10 estão sendo planejados, 12 pararam por motivos econômicos e 2 decretaram falência. Destas, apenas 2 são comerciais, sendo elas a Beta Renewable (Crescentino, Itália) e a Borregaard Industries AS (Sarpsborg, Noruega). A primeira produz 60000 ton.ano⁻¹ de etanol a partir da palha e culturas energéticas e está operando desde 2012. Já a segunda produz 15800 ton.ano⁻¹ de etanol a partir de resíduos da polpação de madeira e atua desde 1938.

As maiores instalações em construção para a produção de etanol celulósico a partir de processos bioquímicos (explosão a vapor e ácidos minerais diluídos) incluem o da Abengoa (EUA, 75000 ton.ano⁻¹), a POET-DSM's (EUA, 75000 ton.ano⁻¹), Beta Renewables's (Itália, 40000 ton.ano⁻¹) e a INEOS Bio's technology (EUA, 24000 ton.ano⁻¹). Já para os processos termoquímicos (gaseificação) tem-se a Enerkem's (Canadá, 30000 ton.ano⁻¹).

No Brasil, existe uma planta piloto em operação (Rio de Janeiro) e outra planta comercial que está em construção (Alagoas). A planta piloto pertence à Petrobrás e está operando desde de 2007, com produtividade 270 ton.ano⁻¹ de etanol a partir do bagaço de cana por rota bioquímica. Já planta comercial é uma parceria entre a GraalBio e a Beta Renewables e estará em funcionamento no começo de 2014 com produção de etanol de 65000 ton.ano⁻¹, utilizando como matéria-prima resíduos da cana-de-açúcar (palha e bagaço).

O processo utilizado pela Petrobrás consiste no pré-tratamento da biomassa com ácido em condições brandas para remoção da hemiceluloses; depois, as fibras são submetidas à deslignificação com álcali para remoção parcial da lignina. As etapas de sacarificação e fermentação das fibras deslignificadas para a produção de etanol são realizadas pelo processo *SSF*. Atualmente, a Petrobrás em parceria com Blue Sugar está construindo sua primeira usina em escala comercial e esta deverá ser inaugurada em 2015. A produção de etanol será realizado por tratamento térmico catalisado por ácido do bagaço de cana, seguido de hidrólise enzimática e posterior fermentação. A etapa de fermentação será realizada utilizando microrganismos geneticamente modificado para converter glucose e xilose em etanol.

A **FIGURA 11** mostra as etapas do processo que será utilizado na produção de etanol celulósico pela GraalBio. Este processo é uma tecnologia desenvolvida pela PROESATM e foi adquirida pela Beta Renewables. Segundo testes realizados em escala piloto (Itália, 250 ton.ano⁻¹), a produção de etanol a partir de diferentes materias-primas proporcionou altos rendimentos e baixo custo (\$1,50 por galão). Este processo produz

etanol a partir da fermentação de pentoses e hexoses, sendo que a lignina residual é utilizada para gerar energia para alimentar a planta industrial.

O desenvolvimento de tecnologias viáveis para produção de etanol a partir da biomassa vegetal aumentou muito nos últimos anos. No entanto, os processos estudados até o momento para este tipo de matéria-prima, ainda não estão totalmente consolidados. Embora muitos estudos tenham sido realizados em escala piloto e de demonstração avaliações criteriosas da viabilidade ainda são necessárias antes de disponibilizar o produto no mercado. Neste sentido, a produção em escala comercial envolve alto risco para as empresas que desejam desenvolver essas tecnologias, já que os investimentos são altos e o retorno inicial é baixo. Além disso, o etanol produzido tem que ser de alta qualidade e apresentar preços competitivos aos de fontes convencionais, como o de amido (milho, EUA) e o de sacarose (cana de açúcar, Brasil).

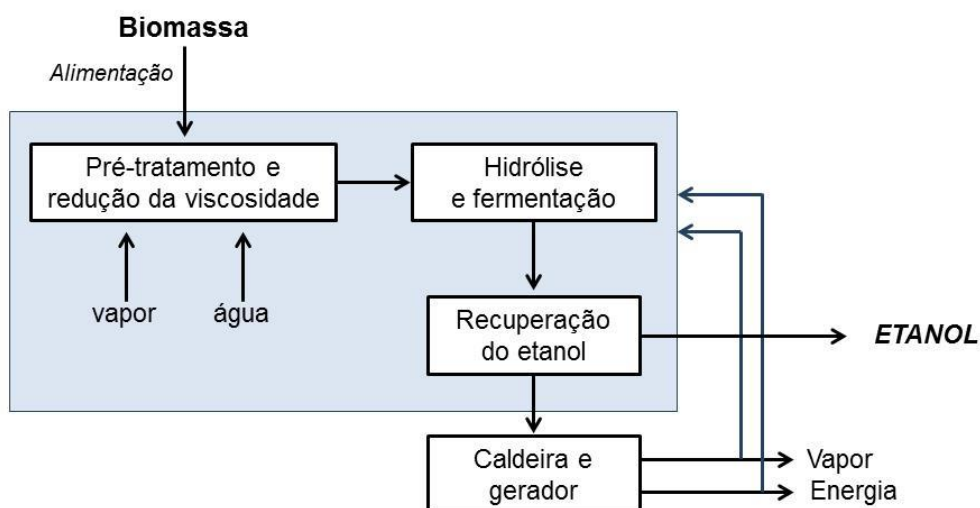


FIGURA 11. TECNOLOGIA DESENVOLVIDA PELA PROESATM PARA PRODUÇÃO DE ETANOL CELULÓSICO E OUTROS PRODUTOS QUÍMICOS A PARTIR DE BIOMASSA.

2. OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar o efeito das modificações químicas sofridas pelo bagaço de cana-de-açúcar após pré-tratamento por explosão a vapor, na presença e na ausência de catalisador ácido (H_3PO_4), e interpretar a sua influência sobre os processos de hidrólise enzimática e fermentação para a produção de etanol celulósico.

Objetivos Específicos

- [1] Caracterizar a composição química do bagaço de cana-de-açúcar *in natura*;
- [2] Otimizar o pré-tratamento por explosão a vapor do bagaço de cana-de-açúcar, na presença e na ausência de catalisador ácido (H_3PO_4);
- [3] Determinar o rendimento das diferentes frações solúveis e insolúveis derivadas do processo de explosão a vapor do bagaço de cana-de-açúcar;
- [4] Caracterizar a composição química das frações solúvel e insolúvel derivadas do pré-tratamento por explosão a vapor do bagaço de cana-de-açúcar;
- [5] Avaliar a suscetibilidade à hidrólise enzimática dos substratos pré-tratados por explosão a vapor, empregando complexos celulásicos comerciais;
- [6] Selecionar as condições de pré-tratamento que proporcionaram os melhores substratos em relação aos rendimentos de sacarificação obtidos na etapa de hidrólise enzimática;
- [7] Avaliar a produção etanol celulósico a partir dos substratos selecionados pelos processos *SHF* e *SSF*;
- [8] Investigar o impacto dos componentes solúveis e insolúveis, decorrentes do pré-tratamento por explosão a vapor, sobre o processo de hidrólise enzimática e fermentação a etanol celulósico;
- [9] Investigar as modificações químicas causadas pelo pré-tratamento na estrutura lignocelulósica e que proporcionaram aumento na acessibilidade química da celulose.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

O bagaço de cana-de-açúcar utilizado neste trabalho foi obtido junto à empresa San Martin (São Paulo/SP), sendo que a sua coleta foi organizada pelo Centro de Tecnologia Canavieira (CTC) e pela Novozymes Latin America (Araucária, PR), parceiros da Universidade Federal do Paraná (UFPR) no projeto CaneBiofuel financiado pela União Europeia (Programa FP7). No total, foram coletados 300 kg de bagaço (base úmida) após a sua moagem para retirada do caldo (sacarose). Parte deste material ficou armazenada em câmara fria em sacos plásticos selados a vácuo e parte foi seca em estufa com circulação de ar a 50°C para evitar a proliferação de fungos devido a sua alta umidade (50%).

A preparação enzimática empregada para a sacarificação dos substratos pré-tratados foi a Cellic CTec 2[®] (celulases), fornecida pela Novozymes Latin América (Novozymes, Araucária, Brasil).

As leveduras utilizadas na fermentação dos substratos foram as estirpes PYCC 4072 e Thermossac[®] Dry de *Saccharomyces cerevisiae*. A primeira pertence à Coleção de Leveduras de Portugal, que foi isolada a partir de uma preparação comercial de levedura seca ativa para vinificação, designada comercialmente como Fermivin[®]. A segunda corresponde a uma preparação comercial de levedura seca utilizada para a produção de álcool combustível e bebidas alcoólicas, que foi fornecida pela Lallemand Ethanol Technology (Milwaukee, Wisconsin, USA).

3.2. Métodos

A **FIGURA 12** mostra de forma resumida as etapas desenvolvidas neste trabalho. Primeiramente, o bagaço de cana *in natura* foi caracterizado conforme as metodologias descritas abaixo e submetido ao pré-tratamento por explosão a vapor. Todos os substratos obtidos após ao pré-tratamento foram divididos em duas partes iguais, contendo tanto a fração sólida fibrosa quanto a fração líquida solúvel em água. Uma parte foi armazenada sob a denominação de material não lavado com água (BEV-SL) e a outra foi submetida à filtração, dando origem a uma fração solúvel (BEV-SA) e outra insolúvel (fibras pré-tratadas). Em seguida, a fração insolúvel obtida após a filtração foi submetida a uma etapa de lavagem com água sob teor de sólidos totais de 5% (m.v⁻¹) e filtrada novamente, originando outra fração insolúvel denominada fração insolúvel lavada com água (BEV-IA).

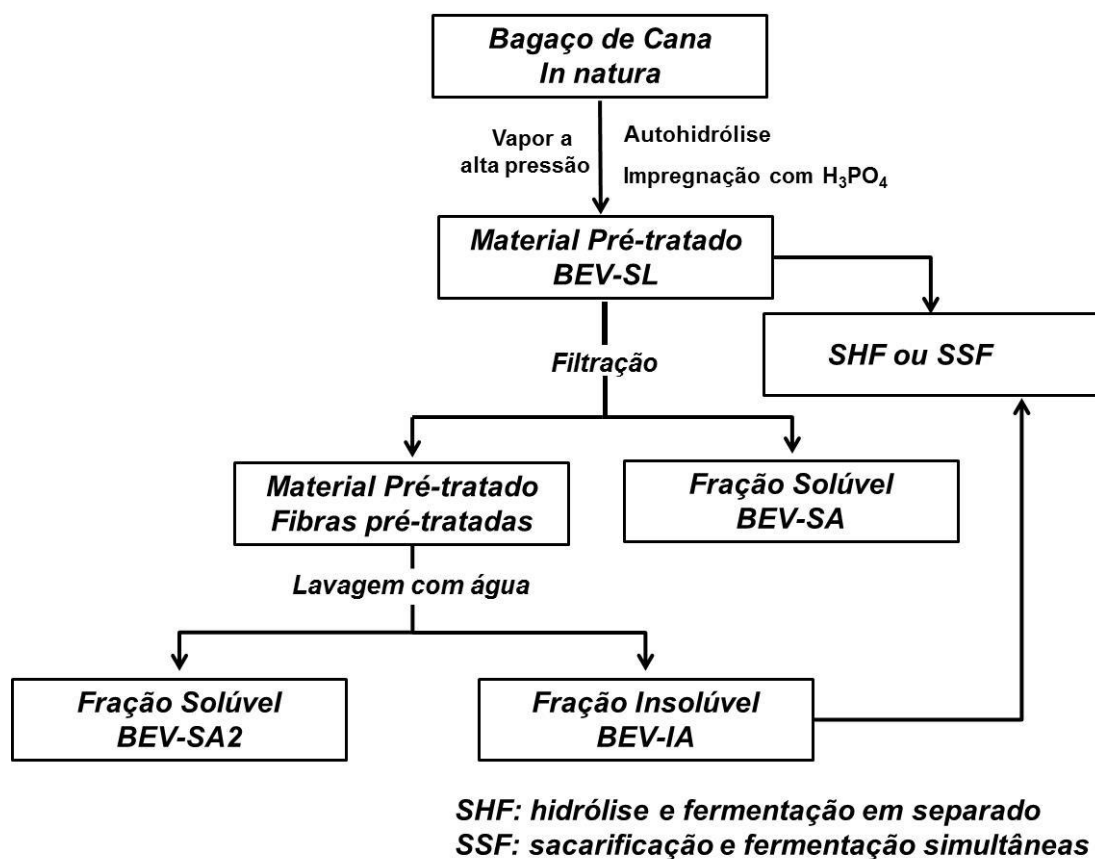


FIGURA 12. FLUXOGRAMA DAS ETAPAS DESENVOLVIDAS NESTE TRABALHO.

Os substratos obtidos após a lavagem do material pré-tratado com água (BEV-IA) foram submetidos a uma etapa de hidrólise enzimática para a escolha dos melhores substratos para serem fermentados pelos processos de *SHF* e *SSF*. Além dos, substratos selecionado, o ponto central do planejamento, tanto lavado (BEV-IA) quanto não lavado (BEV-SL) com água, também foram submetidos aos processos de *SHF* e *SSF* com o objetivo de avaliar a influência dos compostos solúveis gerados durante o pré-tratamento sobre a ação das enzimas e das leveduras.

3.2.1. Determinação da massa seca

Uma quantidade conhecida de material celulósico foi colocada em pesa filtro previamente pesado. Este material foi colocado em estufa a 105°C por 2 h para a eliminação da umidade. Logo após, o material foi esfriado em dessecador sob vácuo, pesado e a massa seca foi calculada em relação à massa do material original. A massa seca também foi determinada utilizando uma balança de infravermelho (Gehaka IV2000) a 125°C até peso constante.

3.2.2. Determinação do teor de cinzas

Uma quantidade conhecida de material celulósico foi acondicionada em um cadinho de porcelana, previamente calcinado e tarado, sendo então calcinada em mufla a uma temperatura de 575°C por 2 h, segundo a norma NREL/TP-510-42622 (SLUITER *et al.*, 2008). O teor de cinzas foi obtido pela diferença de massa entre o cadinho com cinzas e o cadinho vazio, que foi expressa em relação à quantidade de amostra inicial (base seca).

3.2.3. Determinação da composição inorgânica das cinzas

A composição inorgânica das cinzas do bagaço foi determinada no Laboratório de Análises de Minerais e Rochas (LAMIR/UFPR) por fluorescência de raio-X em um aparelho Philips Analytical XRF, modelo PW 2400/00, provido de um amostrador Philips modelo 2510. As cinzas utilizadas para essa determinação foram obtidas segundo a norma TAPPI T413 om-02, calcinando-se o bagaço a 900°C para obtenção dos compostos na forma de óxidos. Para a análise, utilizou-se uma pastilha obtida pela fusão de certa quantidade de cinzas com tetraborato de lítio ($\text{Li}_2\text{B}_4\text{O}_7$) e nitrato de amônio (NH_4NO_3), sob aquecimento por 20 min. Em seguida, a mistura foi despejada em uma pequena bandeja de aproximadamente 5 cm de diâmetro. Ao resfriar, o material foi retirado da bandeja, resultando na pastilha pronta para ser analisada. O teor de cada óxido encontrado foi expresso em relação à massa seca das cinzas.

3.2.4. Extraíveis

Uma quantidade conhecida de bagaço *in natura* foi submetida a um processo de extração em aparelho Soxhlet, com uma seqüência de solventes em ordem crescente de polaridade: éter etílico (EE), diclorometano (DCM), etanol:tolueno (1:2, v.v⁻¹) (ET) e etanol 95% (EtOH), segundo a norma TAPPI T204 om-88, e uma extração em balão de fundo redondo com água quente (AQ), segundo a norma TAPPI T264 om-88. Após cada etapa de extração, o solvente foi removido em evaporador rotativo na temperatura de 50°C e o resíduo foi seco em balão previamente tarado. Por diferença de massas, o percentual de cada extrato foi obtido em relação à massa seca do material originalmente empregado no ensaio.

Os extraíveis foram caracterizados por espectrometria no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) em equipamento Bomen, no intervalo de 400-4000 cm⁻¹,

empregando pastilhas de brometo de potássio (KBr) com concentração aproximada de 1% de amostra em relação a sua massa seca.

3.2.5. Determinação do teor de proteínas

A determinação de proteínas foi realizada no Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos (CEPPA/UFPR) segundo a metodologia 991.20 da AOCS (2005). O método, conhecido como micro-Kjeldahl, consiste em digerir de 0,5 a 0,8 g de amostra em um tubo de Kjeldahl com 2,5 g de uma mistura catalítica (K_2SO_4 e $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 10:1 m.m⁻¹) e 7 mL de H_2SO_4 concentrado. A mistura foi aquecida lentamente em um bloco digestor, mantendo a temperatura em 50°C por 1 h. Em seguida, a temperatura foi elevada gradativamente até atingir 350-400°C. Após o líquido se tornar límpido e transparente, de tonalidade azul-esverdeada, a amostra foi retirada do aquecimento e deixada esfriar, para então adicionar 10 mL de água e NaOH 50 % (m.v⁻¹). O tubo de Kjeldahl foi adaptado a um destilador, sendo procedida a destilação. O destilado (amônia) foi recolhido em um Erlenmeyer contendo 20 mL de H_3BO_3 (ácido bórico) a 4% (m.v⁻¹) e 4-5 gotas de um indicador misto (0,13 g de vermelho de metila e 0,06 g de verde de bromocresol em 200 mL de álcool etílico 70% (v.v⁻¹)). O ponto final da destilação foi testado com papel indicador até resposta negativa à alcalinidade. Em seguida, a solução foi titulada com ácido sulfúrico 0,05 mol.L⁻¹ até viragem do indicador. O teor de nitrogênio total foi calculado pela equação:

$$\%NitrogênioTotal = \frac{V \times M \times 2 \times f \times 0,014 \times 100}{P}$$

onde V é o volume de solução de H_2SO_4 0,5 mol.L⁻¹ gasto na titulação, M e f são a molaridade da solução e o fator de correção da solução de H_2SO_4 0,05 mol.L⁻¹, respectivamente, e P é a massa de amostra em gramas. O teor de proteínas foi obtido multiplicando a porcentagem de nitrogênio total por 6,25.

3.2.6. Análise química pelo método da lignina de Klason

A composição química do bagaço livre de extrativos e do material pré-tratado foi realizada de acordo com o método NREL/TP-510-42618 (SLUITER *et al.*, 2008) para a determinação de lignina de Klason. O teor de lignina insolúvel em meio ácido (lignina de Klason) foi determinado por gravimetria e a lignina solúvel em ácido foi quantificada por espectroscopia no ultravioleta (DENCE e LIN, 1992). Já as composições em carboidratos

dos substratos celulósicos, e seus respectivos produtos de desidratação, foram determinadas por cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE) dos hidrolisados ácidos resultantes da determinação de Klason, usando um sistema cromatográfico a líquido Shimadzu modelo LC10AD, provido de um amostrador automático SIL10A, degaseificador de fase móvel modelo DGU 14A, forno de aquecimento de coluna modelo CTO 10A e detectores modelos RID10A para índice de refração e SPD-M10Avp para espectrofotometria no ultravioleta. As composições em carboidratos foram determinados em coluna Aminex HPX-87P (Bio-Rad) a 80°C, eluída com água ultrapura a uma vazão de 0,6 mL.min⁻¹ após neutralização das amostras com carbonato de cálcio (CaCO₃). Para os produtos de desidratação (hidroximetilfurfural e furfural) e ácido acético, a análise foi realizada em coluna Aminex HPX-87H (Bio-Rad) a 65°C, eluída com fase móvel H₂SO₄ 5 mmol.L⁻¹ a uma vazão de 0,6 mL.min⁻¹. A quantificação foi efetuada por padronização externa, com curvas de calibração construídas para cada componente monitorado, celobiose, glucose, galactose, xilose, arabinose, ácido fórmico, ácido acético, hidroximetilfurfural e furfural, levando-se em conta seus respectivos fatores de hidrólise ácida decorrentes da incorporação de uma molécula de água durante o processo hidrolítico. Estes fatores, que foram de 0,95 para a celobiose, 0,90 para a glucose e galactose, 0,88 para xilose e arabinose e 0,72 para o ácido acético, serviram para converter cada componente em seus respectivos derivados anidros (PITARELO *et al.*, 2012). Os produtos de desidratação de hexoses e pentoses (hidroximetilfurfural e furfural) também foram quantificados, entretanto, estes não foram convertidos nos seus respectivos carboidratos de origem, pois não é possível saber o percentual real de desidratação de cada açúcar individualmente durante o procedimento de hidrólise ácida.

3.2.7. Determinação do grau de polimerização por cromatografia de permeação em gel (GPC)

A distribuição de massas moleculares (MM) dos polissacarídeos derivados do bagaço de cana foi obtida por cromatografia de permeação em gel (GPC) de seus derivados tricarbamilados, de onde foram calculados os graus de polimerização (GP) da celulose e das hemiceluloses, bem como a polidispersão das amostras.

A carbamilação das amostras liofilizadas foi realizada em suspensão com dimetilsulfóxido (DMSO) e isocianato de fenila em tubos fechados, por um período de 48 h, em bloco de aquecimento a 80°C. Após este período, a mistura foi precipitada em metanol:água (80:20, v.v⁻¹). O precipitado foi lavado três vezes com a solução metanol:água, seco em dessecador sob vácuo contra P₂O₅, acondicionado em tubos fechados e reservados para posterior análise por GPC (RAMOS, 2001).

As análises foram realizadas utilizando um cromatógrafo a líquido Waters modelo 1515 e quatro colunas TSK Gel (7,8 x 300 mm) em série, cujos limites de exclusão corresponderam a 4×10^7 (TSK 6000 HXL), 4×10^5 (TSK 4000 HXL), 6×10^4 (TSK 3000 HXL) e 1×10^3 (TSK 1000 HXL) unidades de massa atômica. As análises foram realizadas a 45°C tendo tetrahidrofurano (THF) como fase móvel a uma vazão de 1 mL.min⁻¹. As amostras foram monitoradas por índice de refração e espectrofotometria no ultravioleta (UV/Vis) em 240 nm, utilizando instrumentos Waters modelos 2414 e 2487, respectivamente.

A curva de calibração foi gerada a partir do perfil de eluição de vinte padrões monodispersos de poliestireno (Fluka Analytical). O cálculo da massa molar aparente foi realizado pelo método de calibração universal utilizando os coeficientes de Mark-Houwink disponíveis na literatura (VALTASAARI e SAARELA, 1975). Assim, baseados na curva de calibração dos padrões de poliestireno, foi possível calcular o número molecular médio (ou média aritmética das massas moleculares, MM_N) e a massa molecular média (ou média ponderada das massas moleculares, MM_M) da celulose per-carbamilada. O grau de polimerização (GP) foi determinado pela relação de $GP = MM/519$, onde o denominador corresponde à massa molecular de uma unidade de anidroglicose per-carbamilada (RAMOS *et al*, 1992).

3.2.8. Isolamento e caracterização dos principais componentes do bagaço

3.2.8.1. Holocelulose, hemiceluloses e α -celulose

Uma quantidade conhecida de amostra seca e livre de extrativos foi acondicionada em um Erlenmeyer contendo 110 mL de água destilada. Foram adicionados à suspensão 3 mL de ácido acético glacial, 21,5 mL de acetato de sódio 20% (m.v⁻¹) e 8,5 mL de clorito de sódio 40% (m.v⁻¹). Em seguida, a mistura foi agitada, tampada e colocada em banho a 75°C por 2 h, agitando o frasco frequentemente. Após 30 min de reação, as mesmas quantidades de ácido acético, acetato de sódio e clorito de sódio foram readicionadas ao meio. Esta operação foi repetida mais duas vezes até um tempo total de 2 h de reação, para que quase toda a lignina presente no bagaço fosse extraída. Após esse tempo, a mistura foi filtrada em cadinho Gooch 2 previamente tarado e o resíduo foi lavado com 1 L de água gelada e 2 vezes com acetona. O material fibroso foi seco em estufa a 105°C, obtendo-se assim a holocelulose.

Para obtenção da hemicelulose A, 100 mL de KOH 5% foram adicionados em um Erlenmeyer a 3 g de holocelulose e a mistura foi deixada em banho a 25°C por 120 min. O frasco foi agitado a cada 10 min. Posteriormente, o material foi filtrado, lavado

novamente com a solução alcalina (KOH 5%) e depois com água. O filtrado foi transferido para uma proveta de 1 L e o volume foi completado com etanol/ácido acético 1:1 (v.v⁻¹). Após decantação por 24 h, o sobrenadante foi sifonado e o resíduo sólido, correspondente à hemicelulose A, foi centrifugado por 15 min a 3000 rpm e lavado com água destilada, etanol e éter. O material residual (fibra) foi então tratado com solução de KOH 24%, empregando o mesmo procedimento experimental, para a obtenção da hemicelulose B. Depois da extração das hemiceluloses, o resíduo fibroso foi lavado com água até que o pH se tornasse neutro e, em seguida, lavado com pequenas porções de acetona, sendo seco em estufa a 50°C para obter a α -celulose do bagaço de cana.

A composição química da holocelulose, das hemiceluloses e da α -celulose foi determinada pelo método NREL/TP-510-42618 descrito por Sluiter *et al.* (2008) (vide item 3.2.6) e os espectros no infravermelho (FTIR) foram obtidos empregando pastilhas de KBr com concentração de 1% de amostra em equipamento Bomen, no intervalo de 400-4000 cm⁻¹.

3.2.8.2. Lignina

Com a finalidade de se obter uma boa quantidade de lignina para os estudos de caracterização, optou-se pela extração dos materiais lignocelulósicos com uma mistura de dioxano:HCl 2 mol.L⁻¹ (9:1) (FUKUSHIMA e HATFIELD, 2001). Aproximadamente 5 g de bagaço livre de extraíveis foram colocados em balão de fundo redondo e adicionados de 100 mL da solução ácida de dioxano. A mistura foi então refluxada por 30 min sob atmosfera de N₂. Após resfriamento, a solução foi filtrada a vácuo e o resíduo sólido foi lavado com 20 mL de dioxano 96%. A solução foi neutralizada com bicarbonato de sódio. Em seguida, a solução foi filtrada a vácuo por meio de uma membrana de náilon e o volume reduzido para 20 mL em rotaevaporador a 40°C. A solução concentrada foi então gotejada em frascos de centrifugação contendo 200 mL de água destilada, que foram rapidamente agitados. O precipitado formado foi separado por centrifugação (9.000 g, 15 min), isolado e depois dissolvido em 5,0 mL de dioxano (100%), filtrado através de uma membrana de náilon e adicionado gota a gota em frasco de centrífuga contendo 200 mL de éter etílico anidro. Após a floculação, a lignina foi separada por centrifugação (9.000 g, 15 min). Esse último passo foi repedido mais duas vezes. O resíduo foi, então, lavado com 80 mL de éter de petróleo e submetido a uma nova centrifugação. Após a secagem na temperatura ambiente a lignina isolada, foi armazenada em frasco escuro no congelador (FUKUSHIMA e HARFIELD, 2001).

O teor de carboidratos e de lignina total no material fibroso residual e na lignina extraída com dioxano foi determinado segundo o método descrito por Sluiter *et al.* (2008)

(item 3.2.6) e os espectros no infravermelho foram obtidos conforme o procedimento descrito para os extraíveis no item 3.2.4. O rendimento de extração foi calculado em relação ao percentual de lignina presente no material de origem (base seca).

A lignina extraída com dioxano também foi analisada por RMN de ^{13}C para avaliar os detalhes de sua estrutura química e grupos funcionais. O espectro de RMN de ^{13}C foi adquirido por 24 h em um espectrômetro Bruker Avance 400 MHz a 60°C (323K), utilizando tubo de 10 milímetros contendo 700 mg de amostra em 1,8 mL de dimetilsulfóxido hexadeuterado (DMSO- d_6) ($\delta = 39,6$ ppm). Os deslocamentos químicos obtidos no espectro de RMN de ^{13}C da lignina foram comparados com os disponíveis na literatura (DENCE e LIN, 1992).

O percentual de carbono aromático total foi estimado pela integração dos seus deslocamentos químicos (100-162 ppm) no espectro de RMN de ^{13}C . O percentual de grupos metoxila também foi estimado por RMN de ^{13}C , através da relação entre a integração do deslocamento químico do carbono metoxílico (55,7-55,9 ppm) e a região de aromáticos totais (100-162 ppm) (DENCE e LIN, 1992).

3.2.8.2.1. Hidroxilas fenólicas da lignina

Para determinação das hidroxilas fenólicas, empregou-se o método de espectrometria diferencial na região do ultravioleta, que consiste na obtenção de espectros em diferentes condições de pH. Para a obtenção do espectro em meio básico, foi preparada uma solução estoque de lignina (0,5 mg.mL $^{-1}$ em dioxano 96%) e o pH foi ajustado a 13 com NaOH 1,0 mol.L $^{-1}$, enquanto que o espectro em meio ácido, empregado no zero do aparelho, foi gerado a partir de uma solução com pH ajustado a 1 com HCl 1,0 mol.L $^{-1}$. O percentual de hidroxilas fenólicas foi calculado pela equação:

$$\% = \frac{(\Delta 250 \times 0,192)}{C},$$

onde $\Delta 250$ é a absorbância da solução em 250 nm, subtraída da absorbância relativa à linha de base do espectro, e C é a concentração da lignina em g.L $^{-1}$ (GUERRA, 2002).

3.2.8.2.2. Hidroxilas alifáticas da lignina

À amostra (100 mg) foram adicionados 5 mL de mistura ftalante (50 mL de piridina e 5 g de anidrido ftálico) e 2 mL de benzeno. O frasco foi fechado e mantido a 80°C por 3 h. Após este período, foram adicionados 5 mL de água para neutralizar o excesso de

anidrido ftálico e o frasco permaneceu por mais 10 min na temperatura de 80°C. Posteriormente, a amostra foi filtrada em cadinho nº 2 e o filtrado titulado com KOH 0,2 mol.L⁻¹, utilizando como indicador a fenolftaleína. A porcentagem de hidroxilas foi obtida pela equação:

$$\% = \frac{(b-a) \times f \times 170}{m},$$

onde *b* e *a* correspondem aos volumes de KOH gastos na titulação do branco e da amostra, *f* é a concentração do KOH e *m* é a massa da amostra em mg (ZAKIS, 1994).

3.2.8.2.3. Hidroxilas totais

O percentual de hidroxilas totais foi determinado pela soma entre as hidroxilas alifáticas e fenólicas.

3.2.8.2.4. Grupamentos ácidos

Cerca de 40 mg de lignina foram tratados com 5 mL de LiOH 0,1 mol.L⁻¹ e 2 mL de etanol em um frasco fechado, que foi acondicionado a 85°C por 3 min, seguido da adição de 1 mL de cloreto de bário e de repouso até resfriamento. Água foi adicionada até um volume final de 25 mL e, após agitação, foi realizada a centrifugação do material. A 20 mL do sobrenadante foi adicionado 5 mL de HCl 0,1 mol.L⁻¹ e gotas de vermelho de metila. O excesso de ácido foi titulado com LiOH 0,1 mol.L⁻¹ e a porcentagem de grupamentos ácidos foi calculada segundo a equação:

$$\% = \frac{(b-a) \times f \times 212,5}{m},$$

onde *b* e *a* correspondem ao volume de LiOH gastos na titulação do branco e amostra, *f* é a concentração do LiOH e *m* é a massa da amostra em mg (ZAKIS, 1994).

3.2.8.2.5. Carbonilas

Amostras de lignina (80 mg) foram acondicionadas em tubo, onde se adicionou 2 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) e 5 mL de mistura oximante (0,2 mol.L⁻¹ NH₂OH·HCl e 0,08 mol.L⁻¹ trietanolamina). O tubo foi aquecido a 80°C por 2 h e em seguida o conteúdo transferido quantitativamente a um Erlenmeyer com um mínimo de água. Após este

período, o excesso de trietanolamina (TEA) foi titulado com HCl 0,1 mol.L⁻¹ até pH 3,3 e o teor de carbonilas foi obtido pela equação:

$$\% = \frac{(b-a) \times f \times 280,1}{m},$$

onde *b* e *a* correspondem ao volume de HCl gastos na titulação do branco e amostra, *f* é a concentração do HCl e *A* é a massa da amostra em mg (ZAKIS, 1994).

3.2.8.2.6. Acetilação da lignina

A cerca de 50 mg de lignina foram adicionados 2 mL de uma mistura de anidrido acético e piridina (1:1, v.v⁻¹) e a mistura foi deixada por 54 h à temperatura ambiente. Posteriormente, o excesso de anidrido foi destruído com 13 mL de etanol, seguido de repouso por 30 min. Os solventes foram então evaporados sob baixa pressão e a piridina removida por co-evaporação com metanol. A amostra acetilada foi primeiramente dissolvida em clorofórmio e posteriormente seca contra pentóxido de fósforo e lentilhas de hidróxido de potássio em dessecador (DENCE e LIN, 1992). Para confirmação da acetilação da lignina foi realizado uma análise por espectrometria no infravermelho empregando o mesmo sistema descrito no item 3.2.8.1.

O espectro de RMN de ¹H da lignina acetilada foi adquirido por 4 h em um espectrômetro Bruker Avance 400 MHz. Cerca de 30 mg de lignina acetilada foram dissolvidas em 0,5 mL de clorofórmio deuterado (CDCl₃) (δ = 7,29 ppm) contendo 1% de TMS (tetrametilsilano). Os descolamentos químicos obtidos no espectro foram comparados com os disponíveis na literatura (DENCE e LIN, 1992).

A distribuição das massas moleculares da lignina acetilada foi obtida por cromatografia de permeação em gel (GPC). As análises foram realizadas utilizando um cromatógrafo líquido Waters conforme procedimento descrito anteriormente para os polissacarídeos (vide item 3.2.7.), empregando duas colunas TSK Gel (HXL G2000 e G1000). A calibração do sistema foi realizada com uma série de padrões monodispersos de poliestireno e a massa molar aparente das amostras de lignina foi estimada a partir da subtração da massa molar associada aos grupamentos acetila, que foram incomparados durante a etapa de acetilação.

3.2.9. Determinação do índice de cristalinidade (ICr)

A determinação do índice de cristalinidade das diferentes frações do bagaço de cana foi realizada por difração de raios-X (DRX). As análises de DRX foram realizadas

em um difratômetro Shimadzu modelo MAXima X XRD-7000, usando radiação Cu $K_{\alpha}=1,5418 \text{ \AA}$, 30 mA e 40 Kv. A varredura foi de 5 a 40° com velocidade de 2°.min⁻¹. O índice de cristalinidade (ICr) foi estimado expressando a intensidade do pico de difração da celulose cristalina (plano 002, 22° de 2 θ) e a intensidade mínima entre os picos 002 e 101 (18,5° de 2 θ) que corresponde a região amorfa (SEGAL *et al.*, 1959).

$$\% \text{ ICr} = (I_{002} - I_{\text{am}} / I_{002}) \times 100$$

onde I_{002} é a intensidade de difração da parte cristalina a uma posição de 002 e I_{am} é a intensidade de difração da fração amorfa.

3.2.10. Condições de pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar

As amostras de bagaço de cana-de-açúcar foram pré-tratadas por explosão a vapor sob diferentes condições de temperatura e tempo de reação (**TABELA 2**), com e sem a adição de ácido fosfórico como catalisador.

TABELA 2. PLANEJAMENTO FATORIAL 2³ PARA O PRÉ-TRATAMENTO POR EXPLOSÃO A VAPOR DO BAGAÇO DE CANA.

Limites	Variáveis		
	Tempo (min)	Temperatura (°C)	H ₃ PO ₄ (mg.g ⁻¹ bagaço)
Limite inferior (-)	5	180	0
Ponto central (0)	7,5	195	9,5
Limite superior (+)	10	210	19,0
Pontos axiais da projeção no planejamento			
Tempo (-)	3,3	195	9,5
Tempo (+)	11,7	195	9,5
Temperatura (-)	7,5	170	9,5
Temperatura (+)	7,5	220	9,5
H ₃ PO ₄ (-)	7,5	195	0
H ₃ PO ₄ (+)	7,5	195	25,5

O limite inferior foi realizado com o bagaço de cana úmido (50%) sem impregnação ácida (autohidrólise). Os demais experimentos foram realizados utilizando o ácido fosfórico como catalisador em diferentes concentrações. Além disso, foram realizados mais 6 experimentos, que correspondem aos pontos axiais do planejamento.

A impregnação ácida consistiu no borrifamento de uma solução de ácido fosfórico sobre amostras de bagaço com 8% de umidade, buscando elevar o seu teor de umidade até 50% para obter a mesma umidade do bagaço utilizado nos experimentos de autohidrólise. As amostras impregnadas com ácido fosfórico foram, então, acondicionadas em saco plástico selado e conservadas em geladeira até o momento do pré-tratamento, somente sendo abertas após atingir a temperatura ambiente. Os pontos centrais dos planejamentos fatoriais foram realizados em triplicata para determinar a variância do sistema.

3.2.11. Pré-tratamento do bagaço por explosão a vapor

O pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar foi realizado em um reator de aço inox com capacidade para 10 L (**FIGURA 13**), provido de sensores para o controle da temperatura. A pressão é controlada na entrada principal do vapor, cuja injeção no reator é dividida em 3 (três) vias, todas providas de válvulas de alta pressão, o que proporciona uma melhor distribuição do vapor e maior eficiência térmica e, portanto, uma maior homogeneidade durante o pré-tratamento. O reator está acoplado a uma caldeira de alta pressão Weco, modelo GVO 10/30, um compressor de ar e um ciclone, que é empregado para a descarga do material e escape de vapores.

Cerca de 500 g (massa seca) de bagaço de cana, preparado na presença ou na ausência do catalisador (ácido fosfórico), foram introduzidos no reator pré-aquecido. A válvula superior do reator foi então fechada e as válvulas de admissão do vapor foram imediatamente abertas. A partir deste momento, o aumento da temperatura foi acompanhado até que a temperatura desejada fosse atingida. Somente então, a contagem do tempo de pré-tratamento foi iniciada. Ao término do tempo de exposição do material no reator, as válvulas de entrada de vapor foram fechadas e a válvula de esfera (dispositivo mecânico utilizado para controlar o fluxo do material para o coletor), foi imediatamente aberta através de um atuador pneumático para promover a descompressão do material (explosão), o qual foi arrastado para o interior de um ciclone provido de um coletor. Foram realizadas mais duas explosões, só com a injeção de vapor, para garantir a recuperação total do material, que foi então transferido para um balde mantido fechado durante o resfriamento para evitar a perda de voláteis. Com o material já na temperatura ambiente, este foi homogeneizado e uma pequena parte (1 g) foi retirada para determinação de sólidos totais em balança de infravermelho (Gehaka IV200) a 125°C até massa constante. Posteriormente, o material foi dividido em duas partes iguais, contendo tanto a fração sólida fibrosa quanto a fração líquida solúvel em água. Uma destas partes foi armazenada a 4°C em sacos plásticos selados e submetida,

posteriormente, à hidrólise enzimática e fermentação. Portanto, esta fração, denominada BEV-SL, corresponde aos sólidos totais obtidos após o pré-tratamento do bagaço de cana.



FIGURA 13. INSTALAÇÕES DO REATOR DE EXPLOSÃO A VAPOR, LOCALIZADO NO NÚCLEO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE ENERGIA AUTOSSUSTENTÁVEL (NPDEAS) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ.

A outra parte foi submetida à filtração em tela de náilon adaptada a um funil de Büchner, separando a fração solúvel (BEV-SA) da fração insolúvel (fibras pré-tratadas). Uma etapa de lavagem aquosa foi realizada para eliminar açúcares solúveis residuais das fibras pré-tratadas, onde o material fibroso foi mantido sob agitação mecânica por 1 h em uma consistência de aproximadamente 5% (m.v⁻¹). Em seguida, a suspensão foi novamente filtrada em funil de Büchner com tela de náilon, drenado até o menor gotejamento e reservado para determinação da umidade e análises posteriores. As frações obtidas foram denominadas de BEV-SA2 (fração solúvel) e BEV-IA (fração insolúvel).

Os rendimentos das frações insolúveis em água (BEV-IA) foram determinados gravimetricamente em relação a massa seca do bagaço de cana inicialmente submetido ao processo. A caracterização das frações BEV-IA foi realizada segundo as metodologias descritas nos itens 3.2.1, 3.2.2 e 3.2.6.

As frações solúveis da filtração e da lavagem (BEV-SA e BEV-SA2) foram acondicionadas em garrafas plásticas e congeladas para a determinação de sólidos totais e posteriores análises. Alíquotas de 50 mL foram retiradas das frações solúveis em água (BEV-SA) e liofilizadas em liofilizador Jouan, modelo LP3, para determinação dos seus respectivos teores de sólidos totais. Desta forma, os rendimentos das frações solúveis em água foram determinados gravimetricamente e expressos em relação a massa seca do bagaço *in natura*.

3.2.12. Determinação de ácidos fenólicos na fração BEV-SA por eletroforese capilar

Os ácidos fenólicos liberados na fração solúvel após o pré-tratamento foram identificados e quantificados por Eletroforese Capilar (EC) utilizando um equipamento da Agilent Technologies, modelo DE00163645. Os ensaios foram realizados com capilar de sílica fundida Agilent (56 cm e 50 μm – G1600-61232) a 30°C, voltagem de + 30 kV e corrente de 40 μA por 20 min. O tampão utilizado foi o borato de sódio ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$) 15 mmol.L^{-1} (pH 9,12) em metanol 10% (v.v⁻¹). Nove analitos foram monitorados nestas frações usando um detector de espectrofotometria de absorção no ultravioleta (200 nm): *p*-hidroxibenzaldeído, ácido gálico, vanilina, ácido *p*-cumárico, ácido vanílico, ácido siríngico, ácido cafeico, ácido ferúlico e siringaldeído. As amostras liofilizadas e os padrões foram solubilizados em metanol 50% e filtrados em membrana de náilon de 22 μm . A calibração do sistema foi feita por padronização externa.

3.2.13. Hidrólise enzimática

A hidrólise enzimática dos substratos obtidos após o pré-tratamento por explosão a vapor (BEV-IA) foi realizada em triplicata, sempre acompanhada de seus respectivos brancos do substrato e da enzima. Os ensaios enzimáticos foram realizados em uma concentração de 8% (m.v⁻¹) em tampão acetado de sódio 50 mmol.L^{-1} (pH 4,8) a 45°C e 150 rpm (rotações por min) por 96 h. A liberação de açúcares durante o processo hidrolítico foi monitorada por cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE), nos tempos de 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72 e 96 h, usando um sistema CLAE Agilent 1100 provido de um amostrador automático, desgaseificador de fase móvel, forno de aquecimento de coluna e detectores de índice de refração e espectrofotometria no ultravioleta. As análises foram realizada em coluna Aminex HPX-87H (Bio-Rad) a 65°C, precedida por pré-coluna Cátion-H e eluída com fase móvel H_2SO_4 5 mmol.L^{-1} a uma vazão de 0,6 mL.min^{-1} .

Os componentes monitorados foram celobiose e glucose e seus valores foram expressos em relação ao seu polissacarídeo de origem, através da multiplicação por seus respectivos fatores de hidrólise que foram de 0,95 e 0,90. Os rendimentos de hidrólise foram então calculados em relação à quantidade de celulose presente no bagaço de cana pré-tratado. As concentrações de celobiose e glucose foram reunidas e expressas em termos de equivalentes de glucose (EqGlc), já que ambas são carboidratos oriundos da celulose propriamente dita. A hidrólise foi realizada com a enzima comercial Cellic CTec 2 (Novozymes) na concentração de 30 mg de enzima.g⁻¹ de substrato seco.

3.2.14. Modelagem matemática

O efeito do pré-tratamento sobre a degradação da celulose (anidrogucose) e a formação de fufural durante o processo foram avaliados a partir de uma modelagem matemática utilizando o software *Statística* 8.0, em relação as variáveis empregadas no planejamento fatorial. A resposta empregada para a degradação da celulose foi o rendimento de recuperação de anidrogucose obtido após o pré-tratamento (balanço de massas total). Já para a formação de furfural, que ocorre a partir da desidratação de pentoses (hemiceluloses), a resposta utilizada foi a concentração deste componente na fração BEV-SA obtida após o pré-tratamento a vapor. Para cada resposta, um modelo baseado em regressão linear múltipla foi proposto e sua significância estatística foi avaliada por Análise de Variância (ANOVA). Além disso, curvas de nível foram geradas para auxiliar na análise das principais tendências do sistema.

3.2.15. Manutenção dos microrganismos

3.2.15.1. Meio de cultura

O meio de cultura utilizado para a conservação do microrganismo foi o YMA (Yeast extract Malt Agar), com a seguinte composição: glucose 1,0% (m.v⁻¹), peptona 0,5% (m.v⁻¹), extrato de levedura 0,3% (m.v⁻¹) e extrato de malte 0,3 %, agar 2% (m.v⁻¹) em água deionizada. Os compostos foram dissolvidos por aquecimento até a fervura e esterilizados em autoclave a 121°C por 20 min. Em seguida, o meio foi distribuído em placas de Petri esterilizadas no interior de uma capela de fluxo laminar e estas foram posteriormente armazenadas em câmara fria.

3.2.15.2. Condições de crescimento

As estirpes foram repicadas para placas Petri com meio sólido YMA e incubadas em estufa durante 24 a 48 h a 30°C. Este procedimento foi executado em todos os momentos que antecederam os ensaios, de forma a manter a cultura fresca e/ou obter biomassa suficiente para os procedimentos de inoculação.

3.2.15.3. Preparo do pré-inóculo

A preparação do pré-inóculo foi realizada por transferência de uma quantidade de biomassa fresca (item 3.2.15.2) para um balão Erlenmeyer de 500 mL, contendo 300 mL de meio de crescimento composto por 20 g.L⁻¹ de glucose e 6,7 g.L⁻¹ de YNB (Difco Yeast Nitrogen Base) em água. As culturas foram incubadas a 35°C sob agitação orbital de 150 rpm por aproximadamente 24 h.

3.2.15.4. Crescimento celular

O acompanhamento do crescimento celular foi realizado pela leitura da densidade óptica do pré-inóculo a 640 nm (D.O.₆₄₀) em espectrofotômetro Genesys 20 Modelo 4001/4 Thermo Spectronic. Para os testes de crescimento, foram retiradas aliquotas em intervalos de tempos adequados e estas foram diluídas em água deionizada sempre que o valor da D.O.₆₄₀ excedeu 0,5. Já para os experimentos de fermentação, a medida da D.O.₆₄₀ foi realizada no meio de crescimento após as 24 h de incubação, que foi posteriormente centrifugado em tubos esterilizados para remoção do sobrenadante. Com o valor obtido pela medida de D.O.₆₄₀, calculou-se a quantidade de água necessária a ser adicionada ao pré-inóculo concentrado para obter aproximadamente 1 g.L⁻¹ de células no meio de fermentação.

3.2.15.5. Quantificação do crescimento celular

Para determinar a quantidade de biomassa presente nos ensaios, a massa seca contida em 1 mL de suspensão foi determinada utilizando filtro de náilon de 22 µm. Os filtros foram posteriormente colocados em forno de microondas de 900 W por 1 min e depois deixados em dessecador por 20 min para serem pesados em balança analítica. A suspensão foi filtrada e o filtro com a amostra foi novamente tratado no microondas por 2,5 min (900 W), depois mantido em dessecador por 30 min e pesado novamente. A quantidade de biomassa foi determinada por diferença de massas.

3.2.15.6. Determinação da temperatura para os experimentos de fermentação

Neste experimento, a levedura utilizada foi a estirpe PYCC 4072 de *S. cerevisiae*. O pré-inóculo foi preparado conforme descrito no item 3.2.15.3., sendo que o meio de fermentação utilizado continha 50 g.L⁻¹ de glucose em tampão acetato de sódio 50 mmol.L⁻¹ (pH 4,8) e extrato de levedura 1,0 g.L⁻¹ como suplemento, além de (NH₄)₂PO₄ 0,5 g.L⁻¹, MgSO₄.7H₂O 0,025 g.L⁻¹ e 1,0 g.L⁻¹ de células. Os ensaios foram realizados em banho maria nas temperaturas de 30, 35, 40 e 45°C por 11 h, dos quais aliquotas foram retiradas a cada 1,5 h e o acompanhamento do crescimento celular foi realizado pela leitura da densidade óptica a 640 nm (D.O.₆₄₀) (vide item 3.2.15.4.).

3.2.16. Fermentação

O preparo do pré-inóculo para os experimentos de fermentação foi realizado conforme descrito anteriormente (item 3.2.15.3) para obter se aproximadamente 1 g.L⁻¹ de células no meio de fermentação.

Os experimentos de *SHF* foram realizados em duplicata utilizando os hidrolisados enzimáticos dos substratos selecionados (B08 e B16) e do ponto central do planejamento (B05-B07) antes (BEV-SL) e após lavagem com água (BEV-IA). Neste caso, os ensaios de hidrólise enzimática foram realizados a uma concentração de 12% de substrato (m.v⁻¹) e 62,5 mg de enzima.g⁻¹ de substrato seco, nas mesmas condições descritas no item 3.2.13. (45°C, 150 rpm).

Os ensaios de fermentação foram realizados em tampão acetato de sódio 50 mmol.L⁻¹ (pH 4,8), suplementado com extrato de levedura 1,0 g.L⁻¹, (NH₄)₂PO₄ 0,5 g.L⁻¹, MgSO₄.7H₂O 0,025 g.L⁻¹ e 1,0 g.L⁻¹ de células. Para tanto, foram utilizados frascos Erlenmeyer de 50 mL contendo 18 mL de meio de hidrolisado enzimático, 1,0 mL de suplemento e 1,0 mL do inóculo. Os ensaios foram realizados em incubadora de agitação orbital a 35°C e 150 rpm por 24 h, dos quais aliquotas foram retiradas a cada 3 h. Os componentes monitorados foram celobiose, glucose e etanol usando o mesmo sistema cromatográfico descrito no item 3.2.13.

Os experimentos de *SSF* foram realizados em frascos Erlenmeyer de 50 mL com os mesmos substratos utilizados nos experimentos de *SHF* descritos anteriormente, com volume final de reação de 20 mL contendo bagaço de cana pré-tratado (12% m.v⁻¹), enzima (62,5 mg de Cellic CTec 2 por grama de substrato seco), extrato de levedura (1,0 g.L⁻¹), (NH₄)₂PO₄ (0,5 g.L⁻¹) e MgSO₄.7H₂O (0,025 g.L⁻¹) em tampão acetato de sódio 50 mmol.L⁻¹ (pH 4,8), mais o inóculo contendo levedura na concentração de 1,0 g.L⁻¹. Os ensaios foram realizados em incubadora de agitação orbital a 35°C e 150 rpm por 96 h, dos quais aliquotas foram retiradas nos tempos de 6, 12, 24, 48, 72 e 96 h. A

concentração de glucose e a produção de etanol foi quantificada por CLAE usando o mesmo sistema descrito anteriormente para o processo *SHF*.

3.2.17. Crescimento celular na presença de furfural

O ensaio de crescimento celular foi realizado utilizando meio sintético (50 g.L^{-1} de glucose), ao qual foi adicionado furfural em diferentes concentrações (8, 4 e 2 g.L^{-1}) e a fração solúvel (liofilizada ou não) obtida após o pré-tratamento de um dos pontos centrais do planejamento (B05). Os testes foram realizados utilizando 1 g.L^{-1} de células e suplementada com $6,7 \text{ g.L}^{-1}$ de YNB (Difco Yeast Nitrogen Base) a 35°C , 150 rpm por 24 h de reação. Para os experimentos realizados com a fração solúvel, foi adicionado ao meio de crescimento o volume necessário para obter aproximadamente 50% dos compostos gerados nesta fração após o pré-tratamento. Esta estratégia também foi adotada para os experimentos realizados com a fração BEV-SA liofilizada, mas, neste caso, os sólidos liofilizados foram resuspensores em água e depois adicionados ao meio. Os testes de crescimento foram realizados com a fração BEV-SA liofilizada por ter sido constatado que, durante o processo de liofilização, parte dos furanos (furfural e HMF) eram removidos juntamente com água; assim, foi possível avaliar o efeito dos carboidratos e dos compostos fenólicos presentes nesta fração, sem a interferência majoritária dos compostos de desidratação. O acompanhamento do crescimento celular foi realizado pela leitura da densidade óptica das amostras a 640 nm ($\text{D.O.}_{640\text{nm}}$) (vide 3.2.15.4.).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO BAGAÇO DE CANA *IN NATURA*

O bagaço de cana-de-açúcar foi caracterizado em relação a sua composição química e os componentes macromoleculares foram isolados e analisados a fim de investigar sua natureza estrutural, utilizando técnicas de extração, hidrólise cromatografia e espectrometria. Estes dados foram utilizados para determinar os rendimentos de recuperação e calcular o balanço de massas dos principais componentes presentes no bagaço de cana após o pré-tratamento por explosão a vapor, bem como avaliar as modificações químicas e estruturais de cada componente após o pré-tratamento.

4.1.1. Composição química do bagaço de cana

As determinações dos percentuais de cinzas, proteínas e extraíveis foram realizadas diretamente sobre amostras do bagaço *in natura*. Já os percentuais de carboidratos e lignina foram determinados a partir de amostras de bagaço livre de extraíveis, obtidas após extração com uma sequência de solventes em ordem crescente de polaridade.

O teor de cinzas do bagaço *in natura* (BIN) correspondeu a 6,53% (**TABELA 3**) e este teor foi superior ao obtido por outros autores (**TABELA 4**). Essa diferença no percentual de cinzas pode ocorrer em função da variedade da cana empregada e da localização geográfica dos locais de cultivo (MARABEZI, 2009). Além disso, podem estar relacionados a impurezas (terra e fuligem) devido ao local de armazenamento após sua moagem, já que, neste trabalho, o bagaço não foi submetido a uma etapa adicional de lavagem com água. A lavagem com água, além de remover compostos inorgânicos solúveis, também remove sacarose residual que eventualmente permaneceu no bagaço após o processo de moagem e extração exaustiva do caldo da cana-de-açúcar.

O teor de cinzas obtido para o bagaço de cana é baixo em comparação com outras biomassas, tais como palha de arroz e palha de trigo, que têm 17,5 e 11,0% de cinzas, respectivamente (BARCELOS *et al.*, 2012). Neste sentido, a capacidade tamponante do bagaço é inferior a estes materiais, o que oferece uma vantagem frente a processos que utilizam ácidos no pré-tratamento.

Como dito anteriormente, o bagaço de cana foi extraído com cinco solventes em escala crescente de polaridade e água. Esta medida foi tomada para a remoção dos compostos não estruturais, isto é, que não estão ligados diretamente à parede celular, já que estes compostos podem interferir na quantificação dos carboidratos e da lignina que

constituem a parede celular. Os extratos obtidos para cada solvente foram quantificados por gravimetria após remoção do solvente e os resultados estão descritos na **TABELA 3**.

TABELA 3. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR.

Componente	Percentual (%)
Cinzas	6,53±0,20
Proteínas	1,13±0,16
Extraíveis	2,88±0,03
Éter etílico (EE)	0,79±0,01
Diclorometano (DCM)	0,23±0,02
Etanol:tolueno (ET)	1,42±0,05
Etanol 95°(EtOH)	0,44±0,04
Extraíveis em água	1,22±0,05
Anidrogucose ¹	37,96±0,13
Anidroxilose ²	18,89±0,06
Anidroarabinose ²	3,34±0,02
Anidrogactose ²	0,65±0,18
Grupo acetila ²	3,49±0,02
HMF de hexoses não identificadas ³	0,22±0,01
Furfural de pentoses não identificadas ⁴	1,00±0,06
Lignina total ⁵	20,80±0,26
Lignina solúvel	0,23±0,04
Lignina insolúvel	20,57±0,26
Total	98,11

¹ Presente como componente das β -(1→4)-D-glucanas (celulose)

² Presente como componentes das heteroxilanas (hemiceluloses)

³ Produto de desidratação de hexoses: hidroximetilfurfural (HMF)

⁴ Produto de desidratação de pentoses: furfural

⁵ Lignina insolúvel e lignina solúvel em ácido sulfúrico diluído

O total de compostos extraíveis do bagaço de cana foi de 4,10%, sendo que 2,88% foram extraídos utilizando a sequência de solventes orgânicos e 1,22% foram extraídos com água quente. O solvente que extraiu a maior quantidade de substâncias foi a mistura etanol:tolueno (1,42%), seguido pela água quente (1,22%). Em geral, a mistura etanol:tolueno extrai compostos como ácidos fenólicos, ácidos graxos, ceras, lignanas e outros compostos oxigenados (e.g., flavonóides). Já a extração com água quente extrai, principalmente, carboidratos hidrossolúveis como sacarose e pectina (SOUZA *et al.*, 2005). Entretanto, o percentual de sacarose residual presente em amostras industriais de

bagaço de cana é inferior a 1% (PITARELO, 2007), indicando que o principal carboidrato presente no extrato aquoso é, provavelmente, a pectina.

Para identificar os grupos funcionais presentes nos extraíveis de cada solvente utilizado para extração, foram realizadas análises por espectrometria no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). Os espectros obtidos estão apresentados na **FIGURA 14**.

Em geral, os extraíveis obtidos com éter etílico (EE) apresentaram um espectro de FTIR típico de compostos orgânicos alifáticos de baixa polaridade. Essa conclusão é resultado da presença de deformações axiais em 2920 e 2850 cm^{-1} de CH ligados em CH_3 e CH_2 , respectivamente, bem como da deformação angular de CH em CH_2 em 1463 cm^{-1} . Outras evidências nos espectros de FTIR, incluindo a ausência de vibração do estiramento de grupos OH associados, sugerem que tais extrativos são compostos principalmente por lipídios, ácidos graxos, terpenos e ceras.

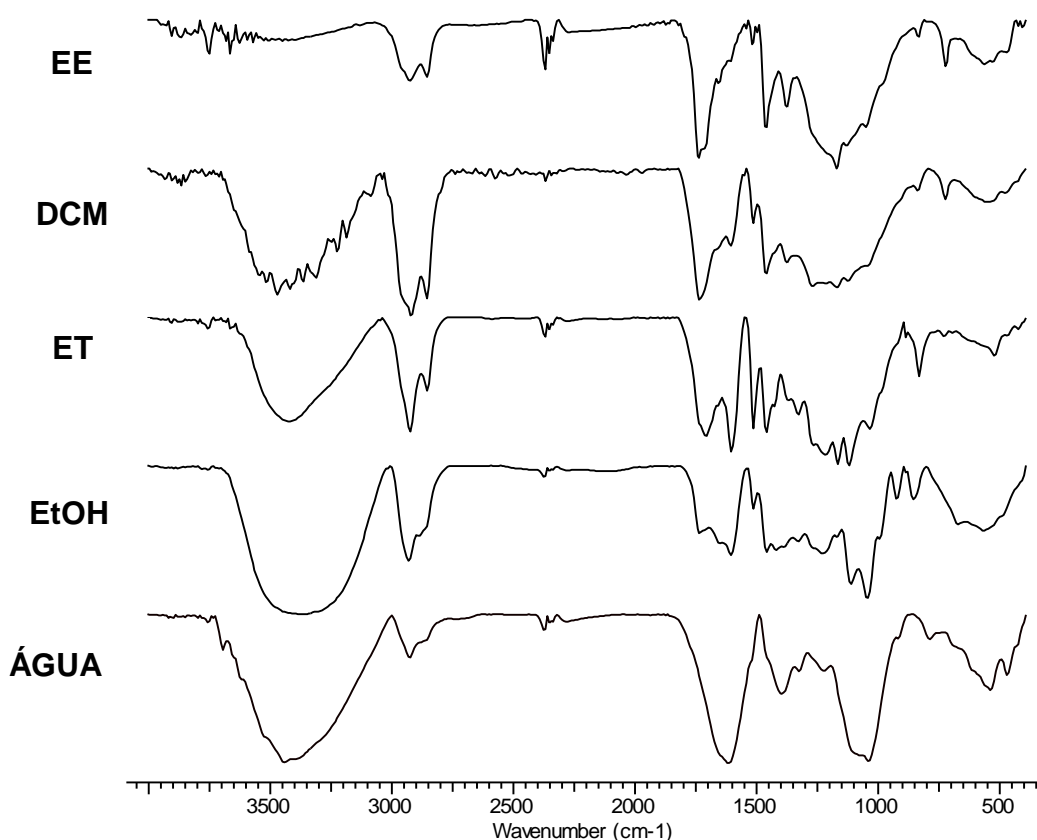


FIGURA 14. ESPECTROS DE FTIR DOS EXTRAÍVEIS DO BAGAÇO DE CANA EM ETÉR ETÍLICO (EE), DICLOROMETANO (DCM), ETANOL:TOLUENO (ET), ETANOL (EtOH) E ÁGUA.

No espectro dos extraíveis em DCM, vibrações de anel aromático (-C=C-) foram inicialmente observadas em 1540 cm^{-1} e se tornaram relativamente predominantes no espectro dos extraíveis com ET. As bandas na região de $3400\text{-}3300\text{ cm}^{-1}$ foi atribuída à vibração do estiramento de OH associado, enquanto que a banda em 1350 cm^{-1} corresponde à vibração angular no plano da ligação O-H de álcoois e fenóis. Já as bandas em 1029 e 1168 cm^{-1} correspondem às deformações axiais de C-O em álcoois primários e de estiramento O-C-O em acetais e éteres glicéricos, respectivamente. Essas bandas foram predominantes nos espectros de FTIR das últimas duas famílias de extrativos, particularmente nos extraíveis com água, cuja hidrofiliidade e perfil de FTIR são típicos de carboidratos hidrossolúveis. Os espectros dos extraíveis em DCM, ET e EtOH apresentaram grande semelhança aos obtidos em estudos anteriores para o bagaço de cana (PITARELO, 2007). O único fator que diferenciou um espectro do outro foi a intensidade das bandas.

Pelo método de determinação de lignina insolúvel em meio ácido proposto por Sluiter *et al.* (2008), foi possível determinar a quantidade de lignina total da amostra de bagaço livre de extraíveis, bem como quantificar os principais monômeros constituintes dos polissacarídeos por análise cromatográfica dos hidrolisados. Os valores obtidos para cada constituinte foram calculados em relação à massa inicial seca do bagaço livre de extraíveis. No entanto, para obter a composição química do bagaço de cana *in natura*, que se encontra registrada na **TABELA 3**, os teores de anidroglicose, de anidroxilose, de anidrogactose, de anidroarabinose, do grupo acetila e da lignina (solúvel e insolúvel) foram expressos em relação massa inicial do bagaço de origem (100%) descontado os teores de cinzas, extraíveis e proteínas.

O percentual de glucanas (medidas como anidroglicose) no bagaço foi de 37,96%, enquanto que o percentual de hemiceluloses foi de aproximadamente 27%, considerando a presença de xilose, arabinose, gactose e grupo acetila. O teor de lignina total correspondeu a 20,80%, a partir do somatório de lignina solúvel e insolúvel em meio ácido (**TABELA 3**). Estes resultados mostram que 65% da composição química do bagaço de cana é constituída por carboidratos, fator importante para um bom desempenho na produção de hidrolisados ricos em açúcares e sua posterior fermentação.

Os percentuais de furfural e hidroximetilfurfural (HMF) descritos na **TABELA 3**, correspondem aos produtos de desidratação de pentoses e hexoses formados durante a hidrólise ácida. O furfural é formado pela hidrólise e desidratação de unidades de xilose e arabinose presentes nas hemiceluloses. Da mesma forma, a quantidade de HMF presente nos hidrolisados teve origem na desidratação de hexoses como glicose e gactose. No entanto, tais percentuais não puderam ser convertidos aos seus

polissacarídeos de origem porque não é possível determinar o percentual de desidratação de cada açúcar individualmente durante o procedimento de hidrólise ácida. Por exemplo, a formação de HMF pode ser atribuída tanto à desidratação de hexoses provenientes da celulose como das hemiceluloses (anidrogactose). Entretanto, quando convertidos a pentoses e hexoses aplicando-se os seus respectivos fatores de conversão mássica, os percentuais obtidos foram de 1,56 e 0,31%, respectivamente. Considerando que o furfural e o HMF tenham sido formados pela desidratação da anidroarabinose e da anidrogactose, respectivamente, já que estes monossacarídeos são mais suscetíveis à reações de hidrólise e desidratação que os demais, os percentuais destes monossacarídeos no bagaço de cana aumentariam para 4,9% e 0,96%, respectivamente.

A **TABELA 4** apresenta uma comparação entre os resultados obtidos no presente trabalho com outros disponíveis na literatura para o bagaço de cana livre de extraíveis, sempre em relação aos principais componentes da parede celular: celulose, hemiceluloses e lignina, juntamente ao teor de cinzas. Estes resultados, diferentemente dos apresentados na **TABELA 3**, não foram ajustados em relação aos percentuais cinzas, proteínas e extraíveis, mas expressos em relação à massa seca de bagaço livre de extraíveis que foi utilizada durante o procedimento de caracterização (hidrólise ácida).

TABELA 4. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS PRINCIPAIS COMPONENTES DO BAGAÇO DE CANA LIVRE DE EXTRAÍVEIS.

Componente (%) ¹	Este trabalho	Qiu <i>et al.</i> , (2012)	Rocha <i>et al.</i> , (2012)	Silva <i>et al.</i> , (2011)	Marabezi (2009)
Glucanas	41,63 (37,96) ⁴	40,87	42,30	46,00	40,21
Hemiceluloses ²	28,86 (26,37) ⁴	22,55	28,80	28,70	27,14
Lignina total ³	22,82 (20,80) ⁴	24,81	24,70	22,80	20,70
Cinzas	6,72	1,44	3,50	2,80	0,93
Extraíveis ⁵	2,88	1,49	-	2,04	2,90

¹ Expresso em relação à massa seca do bagaço de cana livre de extraíveis.

² Expressa a somatória dos valores de anidroxilana, anidroarabinose, anidrogactose e grupo acetila.

³ Expressa a somatória dos valores de lignina solúvel e insolúvel em ácido.

⁴ Expressos em relação à massa seca do bagaço *in natura* (tabela 3).

⁵ Percentual de extraíveis obtido a partir da extração sequencial em Soxhlet com vários solventes orgânicos

Para a análise do teor de extraíveis, diversos solventes podem ser utilizados, entre eles éter etílico, clorofórmio, acetona, diclorometano, etanol 95%, água e até mesmo algumas misturas de solventes, como tolueno:etanol (2:1 v.v⁻¹). Segundo Sluiter *et al.* (2008), a remoção de extraíveis de gramíneas como o bagaço de cana é mais eficiente quando o etanol 95% é empregado como solvente. Entretanto, dos trabalhos apresentados na **TABELA 4**, apenas Qiu *et al.* (2012) optaram por utilizar este solvente,

sendo que, nos outros trabalhos, uma mistura de solventes foi empregada, como ciclohexano:etanol (1:1, v.v⁻¹) (MARABEZI, 2009; ROCHA *et al.*, 2012) e etanol:tolueno (1:1, v.v⁻¹) (SILVA *et al.*, 2011). Desta forma, constatou-se que as extrações com etanol 95% (QIU *et al.*, 2012) e com a mistura etanol:tolueno (SILVA *et al.*, 2011) apresentaram eficiência de 52 e 71%, respectivamente, quando comparada à extração sequencial com diferentes solventes orgânicos realizado no presente trabalho. Já a remoção dos extraíveis com a mistura ciclohexano:etanol (MARABEZI, 2009) mostrou ser tão eficiente quanto a sequência de solventes empregada neste trabalho.

Ao compararmos os valores obtidos neste trabalho com os disponíveis na literatura para o bagaço de cana (**TABELA 4**), nota-se que os teores de glucanas, hemiceluloses e lignina foram muito semelhantes quando os resultados foram expressos em relação à massa seca do bagaço livre de extraíveis, porém, ao expressarmos os valores em relação ao bagaço de origem (vide valores entre parenteses), os resultados obtidos neste trabalho são inferiores, já que estes foram ajustados para os demais componentes presentes no bagaço de origem (extraíveis, cinzas e proteínas) que, naturalmente, influenciam nos valores percentuais assumidos por cada um destes componentes.

De acordo com a **TABELA 4**, os percentuais de glucanas, hemiceluloses e lignina total variam de 40 a 46%, 22 a 29% e 21 a 25% em amostras de bagaço de cana livre de extraíveis. Silva *et al.* (2011) obtiveram o maior percentual de glucanas em relação aos demais trabalhos. Já para as hemiceluloses, os valores relatados foram muitos semelhantes entre si, exceto para Qiu e colaboradores (2012), que apresentaram um decréscimo de aproximadamente 6 pontos percentuais no teor de hemiceluloses. No caso da lignina, os percentuais não variaram muito, apresentando uma média de $23,17 \pm 1,69\%$. Por outro lado, o teor de cinzas obtido no presente trabalho foi superior aos dados da literatura aqui confrontados, como já descrito anteriormente.

4.1.2. Caracterização das cinzas

A caracterização dos compostos inorgânicos (cinzas), na forma de óxidos, foi realizada por fluorescência de raios-X das cinzas derivadas do bagaço de cana calcinado a 900°C, de onde se obteve um percentual de 5,25% de cinzas. Esta redução no teor de cinzas, em comparação com a calcinação realizada a 525°C (6,53%, **TABELA 3**), foi atribuída à perda de carbonato devido ao tratamento térmico em temperaturas mais elevadas. O total de óxidos que estavam presentes acima do limite de detecção da técnica estão descritos na **TABELA 5** e estes corresponderam a 99,71% da massa total das cinzas. Por outro lado, alguns óxidos presentes nas cinzas do bagaço de cana foram

detectados apenas qualitativamente, por estarem abaixo do limite de detecção da técnica (1000 ppm), sendo eles: CuO, Nb₂O₅, ZnO, ZrO₂ e Rb₂O.

O óxido predominante nas cinzas do bagaço foi o SiO₂. A literatura relata um teor de sílica para o bagaço de cana que varia de 63-75%, além de baixos teores de óxido de ferro, titânio e alumínio, diferente dos resultados obtidos no presente trabalho. Entretanto, quando percentual de SiO₂ foi recalculado descontando os altos teores destes três óxidos, os valores variaram de 58-64%, sendo estes bem mais próximos aos disponíveis na literatura (**TABELA 5**).

TABELA 5. ÓXIDOS PRESENTES NAS CINZAS DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR EXPRESSO EM RELAÇÃO À MASSA TOTAL DE CINZAS.

Óxido (%)	Este trabalho	Literatura ²		
		Hernandez <i>et al.</i> , 1998	Massazza, 1998	Singh <i>et al.</i> , 2000
CaO	2,09 ± 0,00	8,0	2,8	8,4
MgO	1,50 ± 0,01	2,9	1,1	2,9
SiO ₂	33,88 ± 0,08	72,7	75,0	63,2
Al ₂ O ₃	18,52 ± 0,01	5,3	6,7	9,7
Fe ₂ O ₃	29,13 ± 0,26	3,9	6,3	5,4
Na ₂ O	<0,01 ± 0,00	0,8	1,1	-
K ₂ O	3,14 ± 0,01	3,5	2,4	-
TiO ₂	8,60 ± 0,00	0,3	-	-
MnO	0,27 ± 0,05	-	-	-
P ₂ O ₅	2,10 ± 0,05	1,6	4,0	-
perda ¹	0,47 ± 0,00	0,8	0,9	6,9
Total	99,71 ± 0,10	99,8	100,3	96,5

¹ Perda inerente ao fogo (perda ao fogo).

² Óxidos presente nas cinzas do bagaço queimado em caldeira para a produção de energia.

O alto teor de Al₂O₃ foi provavelmente devido à contaminação da amostra com terra. Por outro lado, o alto teor de Fe₂O₃ e TiO₂ no bagaço de cana pode ser atribuído à oxidação e desgaste das lâminas e outros componentes utilizados na usina de cana para moagem e remoção do caldo, o que representou uma importante fonte de contaminação do material. Vale aqui ressaltar que a composição inorgânica do bagaço depende das formas de cultivo, colheita e estocagem, os quais podem influenciar na composição dos minerais presentes na biomassa. Além disso, variações no percentual de alguns óxidos presentes nas cinzas do bagaço podem ser atribuídas à presença de carbono residual (combustão incompleta) e óxidos contaminantes, já que as cinzas utilizadas nos trabalhos

descritos na **TABELA 5** são oriundas da queima do bagaço de cana em caldeiras para a produção de energia.

O teor de CaO, MgO e K₂O (óxidos básicos) fornece informações importantes sobre a capacidade tamponante da fração inorgânica da biomassa da cana, com prováveis consequências sobre a susceptibilidade à explosão a vapor em função da neutralização parcial dos ácidos responsáveis pela hidrólise das hemiceluloses. Os teores de CaO e MgO para o bagaço cana foram inferiores aos relatados na literatura (HERNANDEZ *et al.*, 1998; SINGH *et al.*, 2000), enquanto que teores semelhantes foram encontrados para o K₂O (HERNANDEZ *et al.*, 1998) (**TABELA 5**).

4.1.3. Isolamento e caracterização dos principais componentes do bagaço de cana

Os três principais componentes macromoleculares do bagaço de cana, celulose, hemiceluloses e lignina, foram isolados e caracterizados de acordo com as metodologias descritas nos itens 3.2.8, 3.2.9 e 3.2.10.

4.1.3.1. Holocelulose, hemiceluloses e α -celulose

A partir da extração oxidativa com clorito de sódio da lignina presente no bagaço livre de extraíveis, obteve-se a holocelulose que foi subseqüentemente tratada com hidróxido de potássio (primeiramente a 5% e, em seguida, a 24%) para a obtenção das seguintes frações polissacarídicas: α -celulose (celulose insolúvel em álcali) e hemiceluloses A e B.

Os rendimentos mássicos de extração da holocelulose e das frações dela derivadas (α -celulose e hemicelulose A e B) estão apresentados na **TABELA 6**, enquanto que suas respectivas composições químicas, determinadas pelo método descrito por Sluiter *et al.* (2008), encontram-se na **TABELA 7**.

Primeiramente, observa-se que o procedimento experimental empregado forneceu um bom rendimento de extração, uma vez que o somatório das três frações (α -celulose e hemiceluloses A e B) ficou muito próximo ao percentual obtido de holocelulose, sendo estes de 77,94 e 79,71%, respectivamente (**TABELA 6**). Além disso, o resultado obtido por diferença, que corresponde ao teor de lignina (20,29%), ficou muito próximo ao descrito na **TABELA 3** (20,80%). Por outro lado, os rendimentos mássicos mostraram que a hemicelulose A está presente em um teor três vezes superior ao da hemicelulose B.

Os resultados obtidos neste trabalho para holocelulose apresentaram valores semelhantes aos descritos na literatura. Marabezi (2009) obteve um percentual de 79,9%

de holocelulose e 20,1 % de lignina (expresso por diferença) em experimentos realizados para o bagaço de cana livre de extraíveis. A única diferença observada nos procedimentos foi o tempo de reação, que foi aumentado em 1 h no trabalho realizado por Marabezi (2009). Neste mesmo trabalho, foram realizados experimentos com polpa branqueada de fibra de bagaço com uma quantidade mínima de lignina, com intuito de verificar a perda de polissacarídeo durante o processo de obtenção de holocelulose pelo método oxidativo da lignina. Os resultados mostraram uma perda de aproximadamente 3% de polissacarídeos presentes no bagaço de cana (MARABEZI, 2009). Por outro lado, os resultados descritos por Guimarães e colaboradores (2009) para o bagaço de cana *in natura* (com extraíveis) foram de $71,39 \pm 0,60$ para a holocelulose e $23,33 \pm 0,02$ para a lignina. Tais resultados, inferiores aos obtidos neste trabalho, podem ser atribuídos à não remoção dos extraíveis ou à diferenças na metodologia. Já os resultados obtidos por Caraschi *et al.* (1996) para a extração da lignina do bagaço de cana com clorito de sódio mostram que o percentual de holocelulose (76,5%) e de α -celulose (51,0%) foram muito semelhantes aos descritos na **TABELA 6**, enquanto que o percentual de hemiceluloses (hemicelulose A e B) (27%) foi cerca de 6% inferior.

TABELA 6. RENDIMENTO MÁSSICOS OBTIDO PARA HOLOCELULOSE E SUAS FRAÇÕES.

Componente	Rendimento (%)
Holocelulose	$79,71 \pm 1,82$
<i>Frações derivadas da holocelulose</i>	
Hemicelulose A	$26,74 \pm 0,39$
Hemicelulose B	$6,14 \pm 0,54$
α -celulose	$45,06 \pm 0,95$
Total	77,94

A composição química obtida para holocelulose mostrou que cerca de 7% de lignina permaneceu ligada às fibras após a extração com clorito de sódio (**TABELA 7**), proporcionando rendimento de extração de 67,8% em relação ao bagaço livre de extraíveis. Este resultado foi análogo ao encontrado por Siqueira *et al.* (2013), que obtiveram um percentual de extração de lignina com clorito de sódio de 63,2%.

A análise da α -celulose demonstrou que, apesar de todo o grupo acetila ter sido removido das fibras da holocelulose, a extração com álcali não removeu totalmente as hemiceluloses, gerando uma α -celulose com 2,06% de anidroxilose, 0,68% de anidroarabinose e 1,03% de anidrogactose. Provavelmente, estes carboidratos

compõem uma fração hemicelulósica que permaneceu ligada à lignina residual presente na α -celulose.

TABELA 7. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS CONSTITUINTES DA HOLOCELULOSE, DA α -CELULOSE E DAS HEMICELULOSES A E B.

Componente (%)	Holocelulose	α -Celulose	Hemicelulose A	Hemicelulose B
Anidroglicose	48,41 \pm 2,74	88,22 \pm 0,35	8,50 \pm 0,38	9,23 \pm 0,14
Anidroxilose	27,10 \pm 1,42	2,06 \pm 0,40	66,12 \pm 0,13	50,57 \pm 0,14
Anidroarabinose	2,88 \pm 0,98	0,68 \pm 0,01	6,62 \pm 0,16	7,85 \pm 0,04
Anidrogactose	1,25 \pm 0,41	1,03 \pm 0,19	1,19 \pm 0,14	1,24 \pm 0,20
Grupos acetila	4,82 \pm 0,07	-	5,53 \pm 0,06	6,61 \pm 0,09
Lignina solúvel	0,30 \pm 0,01	0,56 \pm 0,04	4,13 \pm 0,11	3,75 \pm 0,05
Lignina insolúvel	6,70 \pm 0,37	3,87 \pm 2,32	nd	nd
Total	91,46	96,42	92,10	79,25

O percentual de componentes totais para a hemicelulose A foi de 92,10% e para hemicelulose B foi de 79,25% (**TABELA 7**). Parte desta perda foi devida aos componentes não detectados, como o ácido 4-O-metilglucurônico, presente nas hemiceluloses em uma unidade para cada dez de xilose (POPA e SPIRIDON, 2005). Além disso, erros de quantificação podem ter ocorrido por dificuldades na técnica para a recuperação quantitativa das frações de hemiceluloses, como a total decantação das mesmas. Além disso, a composição química das frações hemicelulósicas mostraram um percentual superior de lignina solúvel em comparação com as demais frações, revelando a presença de ácidos cinâmicos como o ácido ferúlico, oriundos da quebra de ligações aril éter da estrutura da lignina que, possivelmente, permaneceram ligados covalentemente às hemiceluloses A e B.

As amostras de bagaço *in natura*, holocelulose, hemiceluloses A e B e α -celulose foram submetidas à reação de carbanilação com o objetivo de se obter compostos solúveis em tetraidrofurano (THF) para posterior análise por cromatografia de permeação em gel (GPC). Com isto, foram determinadas as médias numérica e mássica (MM_M e MM_N) das massas molares das amostras derivatizadas, juntamente aos seus respectivos valores de polidispersidade ($PD = MM_M/MM_N$) e grau de polimerização (GP) (**TABELA 8**). A per-carbanilação de todas as amostras foi comprovada pelo desaparecimento da banda de deformação axial de hidroxilas associadas por FTIR.

A análise por GPC indicou que o processo oxidativo de deslignificação causou uma redução de 36% no grau de polimerização da holocelulose em relação aos polissacarídeos presentes no bagaço *in natura*. A holocelulose do bagaço *in natura*

apresentou um GP_M (grau de polimerização em relação à MM_M) de 1200 unidades de anidroglicose (AnGlc), valor análogo ao geralmente observado em polpas celulósicas para a produção de papel. Portanto, apesar de amplamente aceito como um método de deslignificação altamente seletivo, o branqueamento com clorito de sódio compromete o grau de despolimerização dos polissacarídeos da biomassa, não sendo nem mesmo capaz de preservar a estrutura primária do componente celulósico. Provavelmente, o meio ácido utilizado neste processo de extração da holocelulose causou a hidrólise de ligações glicosídicas que, conseqüentemente, geraram a diminuição observada no GP_M da celulose.

Resultados similares a esta redução do GP_M da celulose já foram descritos anteriormente por Kumar *et al.* (2009) em estudos utilizando amostras de papel de filtro Whatman #1. Nestes estudos, o tratamento com clorito de sódio gerou uma queda de 73% no GP_M da celulose em relação à amostra não tratada, ou seja, de 1500 para 410 unidades de AnGlc na amostra processada. Estes autores postularam que a redução observada se deve à hidrólise ácida e à clivagem oxidativa das cadeias de celulose. Por outro lado, o tratamento com clorito de sódio apresentou um efeito negativo apenas 15% sobre o GP_M da Avicel PH-101 (celulose microcristalina), fato que foi atribuído ao seu baixo GP_M (330 unidades de AnGlc) e, em parte, à sua alta cristalinidade (HUBELL *et al.*, 2010). Estes resultados podem ser explicados pela teoria estabelecida para hidrólise ácida da celulose, que preconiza a ocorrência da reação duas fases, uma muito rápida, que se concentra nas regiões menos organizadas de sua estrutura supramolecular (regiões amorfas e de transição para regiões cristalinas), e outra mais lenta, que ocorre na superfície da região cristalina da celulose (HUBELL *et al.*, 2010). Desta forma, o grau de polimerização de cadeias mais longas seria rapidamente comprometido e a velocidade da reação diminuiria à medida que estas atingem um valor limite de GP, denominado “level-off degree of polymerization” (LODP). Assim, a maior resistência à hidrólise, observada em materiais de baixo GP, é justificada pelo aumento gradativo de sua cristalinidade que, por sua vez, estaria relacionado à hidrólise de ligações glicosídicas das regiões amorfas e à maior tendência que oligômeros de celulose de baixo GP teriam para se reorganizar em estruturas de maior associação molecular (HUBELL *et al.*, 2010).

A polidispersidade (PD) da holocelulose foi maior em relação aos polissacarídeos do bagaço *in natura*, indicando que a remoção da lignina gerou um acúmulo de cadeias poliméricas de menor massa molar, aumentando assim a dispersão da distribuição em comparação com o material de origem. Já a diminuição da PD da α -celulose em relação à holocelulose indica que a remoção das hemiceluloses reduziu a amplitude da distribuição de massas molares da holocelulose, já que estas correspondem a polissacarídeos de massa molar menor do que a de β -D-glucanas como a celulose. Por outro lado, o valor de

PD da hemicelulose A foi maior do que o observado para a hemicelulose B, o que era esperado por apresentar maior valor de GP_M e por ser provavelmente composta por polissacarídeos menos ramificados do que a hemicelulose B.

TABELA 8. GRAU DE POLIMERIZAÇÃO MÉDIO E POLIDISPERSIDADE DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS ISOLADAS DE BAGAÇO DE CANA.

Fração	MM_M^1	GP_M^2	MM_N^3	GP_N^4	PD^5
Bagaço <i>in natura</i> DPR ⁶ (%)	973,053±2,450 0,250	1875	712,145±3,170 0,440	1372	1,37
Holocelulose DPR (%)	621,115±26,170 4,210	1196	375,319±19,460 5,180	723	1,65
Hemicelulose A DPR (%)	187,505±19,250 10,270	361	134,172±13,740 10,240	259	1,40
Hemicelulose B DPR (%)	110,348±1,280 1,160	213	102,433±3,680 3,590	197	1,08
α -Celulose DPR (%)	301,108±6,390 2,120	580	221,612±28,470 12,840	427	1,36

¹ MM_M = massa molar média;

² GP_M = grau de polimerização associado à massa molar média;

³ MM_N = número molar médio;

⁴ GP_N = grau de polimerização associado ao número molar médio;

⁵ PD = polidispersidade ($PD = MM_M/MM_N$);

⁶ DPR = desvio-padrão relativo.

As razões molares dos monossacarídeos do bagaço de cana e suas frações foram calculadas a partir das análises realizadas por CLAE e os resultados estão descritos na **TABELA 9**.

TABELA 9. RAZÃO MOLAR DOS MONOSSACARÍDICAS PRESENTES NO BAGAÇO IN NATURA E NAS FRAÇÕES DELA DERIVADAS (Glc:Xil:Ara).

Fração	AnGlc (%)	AnXyl (%)	AnAra (%)	AnGlc:AnXyl:AnAra
Bagaço <i>in natura</i> (BIN)	37,96	18,89	3,34	1:0,50:0,09
Holocelulose	48,41	27,10	2,88	1:0,56:0,06
Frações derivadas da holocelulose				
Hemicelulose A	8,50	66,12	6,62	1:7,78:0,78
Hemicelulose B	9,23	50,57	7,85	1:5,48:0,85
α -Celulose	88,22	2,06	0,68	1:0,02:0,01

Os resultados mostram que a remoção da lignina aumentou a razão molar entre a AnGlc:AnXyl, passando de 1:0,50 (BIN) para 1:0,56 (holocelulose). Tal aumento não foi

observado para a razão molar entre AnGlc:AnAra, que passou de 1:0,09 para 1:0,06, indicando que parte deste componente foi removido juntamente com a lignina. A hidrólise da anidroarabinose durante a extração da lignina pode ser melhor visualizada quando comparamos as razões molares entre AnXyl:AnAra. Neste caso, a razão molar AnXyl:AnAra foi de 1:0,17 para o BIN e de 1:0,10 para a holocelulose, confirmando a hipótese de que a arabinose está intimamente associada com a lignina e, por isso, é mais facilmente removida pelo tratamento oxidativo com clorito de sódio do que a xilose (FENGEL e WEGNER, 1989).

A razão molar das hemiceluloses revela que a hemicelulose B possui mais unidades de arabinose ao longo da sua cadeia, sendo, portanto, mais ramificada do que a hemicelulose A. Tal resultado pode justificar o maior grau de polimerização e polidispersidade da hemicelulose A em comparação com a hemicelulose B. Por sua vez, a α -celulose é constituída basicamente por anidroglicose.

O índice de cristalinidade do bagaço de cana *in natura* com e sem extraíveis e de suas frações polissacarídicas, holocelulose, α -celulose e hemiceluloses A e B, foi determinado por difração de raios X (DRX) (TABELA 10 e FIGURAS 15 e 16).

O resultado obtido para o bagaço de cana *in natura*, com (BIN) e sem extraíveis (BINE), mostrou que a extração com solventes de diferentes polaridades aumentou o grau de cristalinidade do material em 3,9%. A literatura especializada apresenta resultados inferiores para o ICr do bagaço de cana *in natura* e livre de extraíveis, com resultados que variam de 45-48% (BIAN *et al.*, 2013; GUIMARÃES *et al.*, 2009; TRINDADE *et al.*, 2004). Tal diferença pode ser atribuída à metodologia adotada em cada trabalho (corrente elétrica aplicada, varredura) ou mesmo à diferenças no preparo das amostras (secagem ou liofilização).

TABELA 10. GRAU DE CRISTALINIDADE (ICr) DO BAGAÇO IN NATURA, HOLOCELULOSE, α -CELULOSE E HEMICELULOSES.

Fração	ICr (%)
Bagaço <i>in natura</i> (BIN)	60,9
Bagaço livre de extraíveis (BINE)	64,8
Holocelulose	68,7
α -Celulose	64,2
Hemiceluloses A e B	amorfa

Para holocelulose e α -celulose em comparação com BIN, o índice de cristalinidade aumentou em aproximadamente 7,8 e 3,3%, respectivamente. Este efeito foi atribuído à remoção da lignina e das hemiceluloses durante o processo isolamento

destas frações. Por outro lado, houve diminuição do índice de cristalinidade da α -celulose em 3,5 em relação a holocelulose, indicando que a extração alcalina das hemiceluloses causou uma modificação no arranjo estrutural da celulose, de forma a promover uma estrutura com menor organização molecular, diminuindo sua cristalinidade. Por outro lado, a hemicelulose A como a B apresentaram perfil típico de uma estrutura amorfa (FIGURA 16).

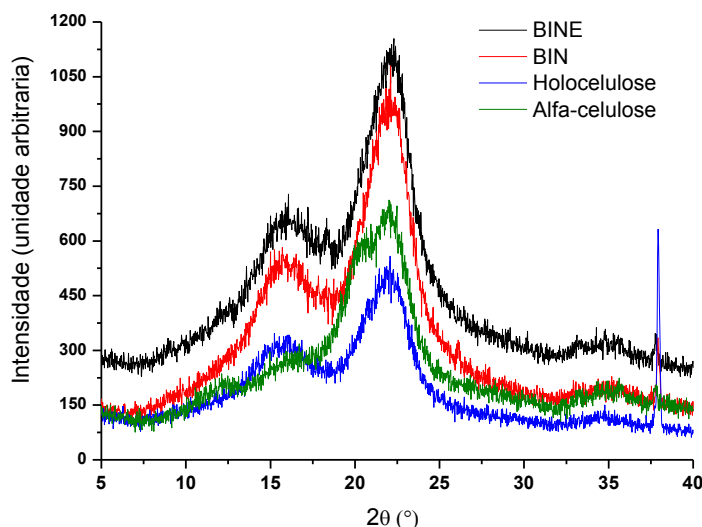


FIGURA 15. PERFIL DE DRX DO BAGAÇO DE CANA IN NATURA COM (BIN) E SEM EXTRAÍVEIS (BINE) E DA SUA HOLOCELULOSE E α -CELULOSE.

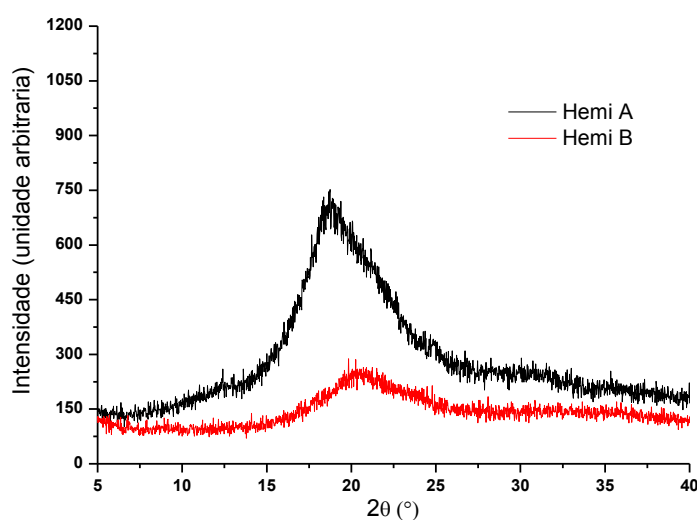


FIGURA 16. PERFIL DE DRX DA HEMICELULOSE A E B DO BAGAÇO DE CANA.

O tratamento alcalino é visto como um agente de inchamento da celulose, o que proporciona maior abertura da estrutura (maior área superficial) devido a remoção da lignina e das hemiceluloses, e permite que as moléculas de água penetrem para o

interior do material. Uma vez que isso ocorre, as ligações entre as hemiceluloses e o complexo lignina-carboidrato são quebradas (BALAT *et al.*, 2008), aumentando a superfície interna da celulose diminuindo a sua cristalinidade (TAHERZADEH e KARIMI, 2008).

A diminuição do ICr observado para a α -celulose pode ser fruto da extração alcalina das hemiceluloses com hidróxido de potássio. A literatura descreve que este tipo de tratamento promove a abertura das cadeias paralelas da celulose I, sendo que, após a remoção desta solução por lavagem aquosa, ocorre a reorganização das cadeias por empacotamento antiparalelo (celulose II), conhecido como mercerização da celulose (OGEDA e PETRI, 2010; BIAN *et al.*, 2013). A celulose II apresenta uma maior densidade de ligações de hidrogênio intermoleculares, devido à disposição das cadeias na célula unitária (inclinada), conferindo maior estabilidade termodinâmica. Por isso, a mudança de celulose I para celulose II é praticamente irreversível (OGEDA e PETRI, 2010; BIAN *et al.*, 2013).

A mudança de cristalinidade da α -celulose pode ser melhor visualizada pela intensidade dos picos cristalinos e do halo amorfo mostrado na **FIGURA 15**. O difratograma obtido para α -celulose do bagaço de cana mostra picos característicos de celulose do tipo II, situados entre os ângulos $13^\circ \leq 2\theta \leq 15^\circ$ e $18^\circ \leq 2\theta \leq 22^\circ$. Já para o bagaço *in natura* com e sem extraíveis e para a holocelulose, o pico cristalino e o halo amorfo ficam situados entre os ângulos $18^\circ \leq 2\theta \leq 19^\circ$ e $22^\circ \leq 2\theta \leq 23^\circ$, respectivamente, o que caracteriza a ocorrência de celulose do tipo I (**FIGURA 15**) (BIAN *et al.*, 2013).

4.1.4. Lignina

A lignina isolada utilizando dioxano:HCl_{aq} é considerada representativa da lignina original, embora pequenas mudanças possam ocorrer durante o processo de isolamento (PERISSOTO, 2005). A **TABELA 11** mostra o rendimento de recuperação da lignina isolada, bem como a composição química do material residual (fibras) que permaneceu insolúvel após o procedimento de extração. O rendimento de extração foi de $82,95 \pm 0,35\%$ em relação ao teor de lignina de Klason presente no material *in natura*. Este resultado foi superior em comparação com a literatura especializada (SIQUEIRA *et al.*, 2013) (63,2%) e com outras técnicas de isolamento como, por exemplo, a extração da lignina do bagaço de cana com Ca(OH)₂ em condições otimizadas (0,49 g de Ca(OH)₂.g⁻¹ de material a 90°C por 90 h) que proporcionou rendimento de 49% (RABELO, 2010).

A composição química das fibras após a extração da lignina foi analisada usando a mesma metodologia descrita por Sluiter *et al.* (2008) e os resultados são apresentados na **TABELA 11**. A partir desses dados, fica claro que grande parte da lignina presente no

bagaço livre de extraíveis foi removida por extração com dioxano:HCl_{aq}, pois apenas 5% de seu teor permaneceu retido nas fibras. As fibras deslignificadas apresentaram alto percentual de glucose, já o teor de hemiceluloses diminuiu, indicando que grande parte destes polissacarídeos foram extraídos juntamente com a lignina. As condições de extração da lignina, que envolvem a presença de um ácido mineral e calor, justificam esse resultado.

TABELA 11. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA LIGNINA E DAS FIBRAS APÓS A EXTRAÇÃO COM DIOXANO: HCl_{aq}.

Componente (%)	Composição química	
	Lignina isolada	Fibras extraídas
Anidroglucose	nd	78,50±0,09
Androxilose	0,59±0,01	9,90±0,11
Anidroarabinose	0,37±0,01	0,59±0,01
Grupo Acetila	nd	nd
Lignina solúvel	2,24±0,10	1,28±0,06
Lignina insolúvel	89,12±1,14	3,94±0,21
Cinzas	-	4,83±0,24
Total	92,32	99,04
Extração lignina¹ (%)	82,95±0,35	

¹ Expressa em relação ao percentual de lignina presente no material *in natura*.

A lignina isolada com dioxano:HCl_{aq} foi inicialmente caracterizada por FTIR (**FIGURA 17**). Segundo Faix *et al.* (1991), as ligninas de bagaço de cana devem ser classificadas como do tipo HGS (unidades *p*-hidroxifenila, guaiacila e siringila), devido à presença de uma pequena banda localizada em 1600 cm⁻¹, que está associada a uma banda em 1125 cm⁻¹, e da banda em 825 cm⁻¹, atribuída às bandas de vibrações aromáticas de C-H fora do plano, característica desse tipo de lignina (HGS) (HOAREAU *et al.*, 2004)

As bandas de baixa intensidade entre 1030 e 1086 cm⁻¹ indicaram a presença de carboidratos contaminantes e são atribuídos ao efeito conjunto da deformação de C-H em aromáticos e da deformação de C-O em alcoóis primários (1030 cm⁻¹) e secundários (1086 cm⁻¹) (GUERRA, 2002). A banda em 1150 cm⁻¹ corresponde às deformações de C-O-C em ligações acetálicas e a região de 1360 cm⁻¹ foi atribuída às deformações angulares de OH no plano. Por outro lado, as bandas em 1140 e 1240 cm⁻¹ foram atribuídas às deformações axiais de C-H e CO-Ar em anéis siringilícos e guaiacilícos, respectivamente, indicando alto teor de grupos metoxílicos. A ocorrência de uma banda

em 1340 cm^{-1} sugere a presença de deformações axiais de C-O e/ou C-H em unidades siringila e guaiacila, o que pode ser parcialmente confirmado pelas bandas de deformação angular de C-H em aproximadamente 825 cm^{-1} nestas mesmas unidades. Já as bandas nas regiões de $1510\text{-}1517$ e $1600\text{-}1620\text{ cm}^{-1}$ podem ser atribuídas a deformações axiais carbono-carbono em anéis aromáticos (unidades *p*-hidroxifenila, guaiacila e siringila).

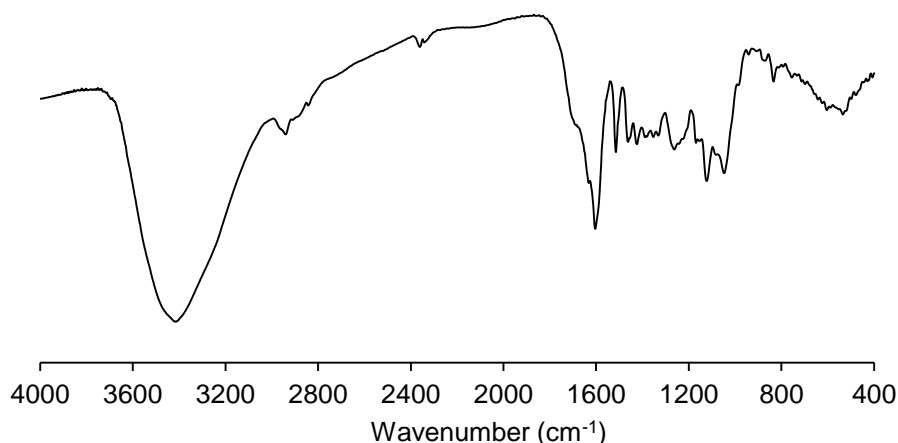


FIGURA 17. ESPECTROS DE FTIR DA LIGNINA APÓS A EXTRAÇÃO COM DIOXANO:HCl_{aq}.

Outras análises também foram realizadas para se obter uma caracterização química mais detalhada da lignina isolada. Os percentuais obtidos para cada grupo funcional estudado são mostrados na **TABELA 12**.

TABELA 12. PERCENTUAL DE GRUPOS FUNCIONAIS PRESENTE NA LIGNINA ISOLADA DO BAGAÇO DE CANA.

Grupo Funcional	Percentual (%)
Hidroxilas fenólicas	1,85±0,07
Hidroxilas alifáticas	4,92±0,04
Hidroxilas totais ¹	6,67
Carbonilas	0,71±0,01
Grupos ácidos	0,27±0,01
Carbonos aromáticos totais ²	87,8
Grupos metoxílicos ²	12,2 (15,4) ³

¹ Somatório de hidroxilas fenólicas e alifáticas

² Relação entre a integração do deslocamento químico OCH₃ entre 55,7-55,9 ppm e a região de aromáticos totais (100-162 ppm) e grupos metoxílicos (55,7-55,9 ppm).

³ Integração da região 3,5-4,0 ppm do espectro de RMN ¹H.

O valor obtido para hidroxilas totais foi de 6,67%, sendo que 1,85% corresponderam às hidroxilas fenólicas e 4,92% às hidroxilas alifáticas. Estes percentuais foram semelhantes aos relatados por Faix *et al.* (1991) que encontraram 1,9% para às hidroxilas fenólicas e estimaram percentuais entre 1-5% para às hidroxilas alifáticas do bagaço de cana. Os resultados obtidos pelos métodos titulométricos para hidroxilas alifáticas e fenólicas (**TABELA 12**) foram semelhantes aos obtidos a partir do espectro RMN de ^1H da lignina acetilada. Neste caso, os valores de hidroxilas alifáticas e fenólicas foram determinados a partir da integração da região de 2,20-2,50 ppm (hidrogênios de acetatos aromáticos) e da 1,50-2,20 ppm (hidrogênios de acetatos alifáticos), que foram de 4,8% para hidroxilas alifáticas e de 2,6% para hidroxilas fenólicas o que correspondeu a um percentual de 7,4% de hidroxilas totais.

O espectro de RMN de ^1H da lignina acetilada, bem como as atribuições para os sinais em comparação com a literatura, são mostrados na **FIGURA 18** e na **TABELA 13**, respectivamente. Os principais sinais observados no espectro RMN de ^1H para a lignina acetilada foram: H em carbonos saturados não oxigenados (0,0 e 1,5 ppm); H em alifático-OAC e Ar-OAc em unidades 5-5 (1,20-2,20 ppm); H em Ar-OAc exceto em unidades 5-5 (2,20-2,5 ppm); H de grupos metoxilícos ligado a anel aromático (3,50-3,90 ppm); H β em β -O-4; β -5, β -1 e estruturas β - β (3,95-4,50 ppm); H aromático em Ar-COR e Ar-R (6,20-7,90 ppm) (**TABELA 13**).

TABELA 13. ATRIBUIÇÕES DOS SINAIS DE RMN DE ^1H PARA LIGNINA ISOLADA E ACETILADA.

Atribuições	δ em ppm/TMS		(%)
	Bagaço	Literatura ¹	
H em carbonos saturados não oxigenados	0,89 e 1,26	0,00- 1,50	15,05
Acetato alifático	1,50-2,22	1,50-2,20	4,83
Acetato aromático	2,20-2,40	2,20-2,50	2,60
H de metoxila	3,55-3,95	3,50-3,90	15,40
H β em β -O-4; β -5, β -1 e estruturas β - β	4,00-4,50	3,90-4,50	10,40
H β em β -O-4; H γ em Ar-CH=CH-CH ₂ OAc	4,50-5,20	4,50-5,20	12,10
H em OAc em estruturas β -O-4, β -5 e β -1	5,20-5,80	5,20-5,75	7,50
H-Ar em Ar-COR e Ar-R	6,20-7,80	6,20-7,90	31,10

¹ Dence e Lin (1992).

² Chen e Rober (1988).

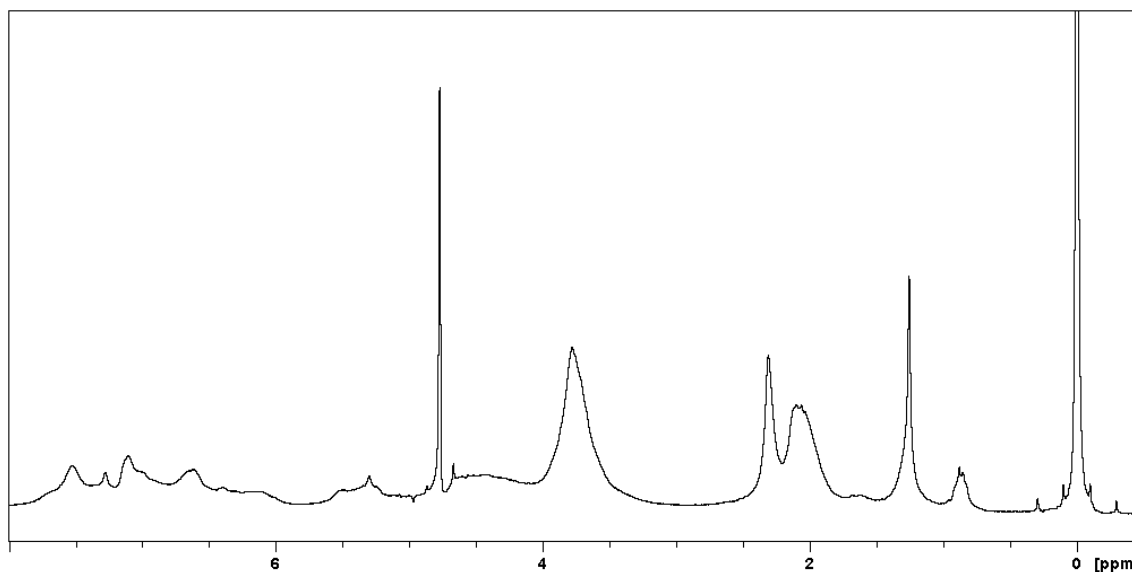


FIGURA 18. ESPECTRO DE RMN DE ^1H PARA LIGNINA DIOXANO ACETILADA DO BAGAÇO DE CANA.

Os grupos metoxilícos são os grupos mais característicos da lignina, variando de 11 a 16% nas coníferas e de 15 a 22% nas folhosas. O percentual de grupos metoxilícos obtido por RMN de ^1H para a lignina extraída do bagaço após sua acetilação foi de 15,4% em relação à integração da região de 3,5-4,0 ppm (**FIGURA 18**). Este resultado foi superior ao obtido por RMN de ^{13}C (**FIGURA 19**), que correspondeu a um percentual de 12,2% em relação à integração da região de aromáticos totais, cujo percentual na estrutura polifenólica da amostra foi de 87,8%. O percentual de grupos metoxilícos detectado por Marabezi (2009) na lignina do bagaço de cana extraído com dioxano:HCl 2 mol.L $^{-1}$, usando RMN de ^{13}C , foi de 15,6% para um total de 84,4% de aromáticos totais, resultados diferentes ao obtido neste trabalho por RMN de ^{13}C . Por outro lado, estes dados mostraram que a lignina do bagaço de cana possui um percentual superior de grupos metoxilícos do que as palhas de milho e de soja, que têm 6,67 e 1,79%, respectivamente (SALIBA *et al.*, 2001). Isto sugere que a lignina do bagaço é menos condensada do que a lignina presente nas palhas de milho e de soja, já que maiores teores de metoxila indicariam a presença de um maior teor de unidades siringílicas em sua estrutura. O espectro de RMN de ^1H mostrou, ainda, sinais na região de hidrogênios aromáticos (6,20-7,90 ppm) e de hidrogênios ligados ao carbono β (4,50-5,20 e 5,20-5,80).

A **TABELA 14** mostra o deslocamento químico encontrado para lignina isolada do bagaço de cana por RMN de ^{13}C , em comparação aos dados disponíveis na literatura.

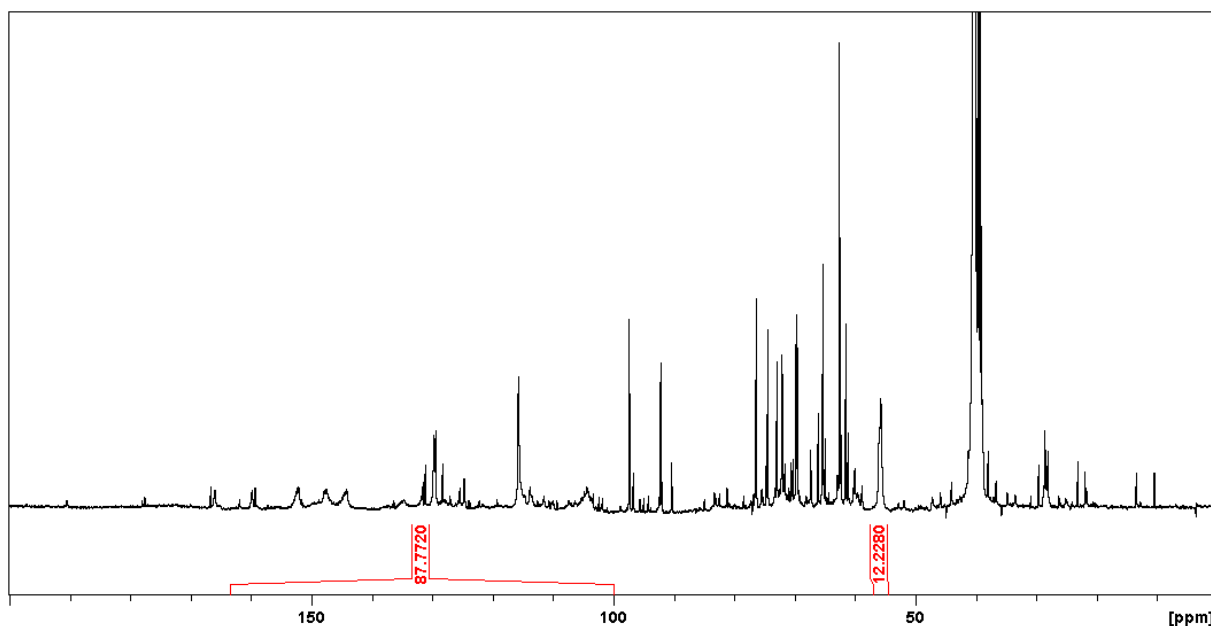


FIGURA 19. ESPECTRO DE RMN ^{13}C PARA LIGNINA DIXANO DO BAGAÇO DE CANA.

Em geral, a amostra apresenta uma série de deslocamentos químicos condizentes com a estrutura típica de ligninas de gramíneas (**FIGURA 19**). Neste sentido, o espectro de RMN de ^{13}C para a lignina pode ser subdividido em três regiões principais: a primeira região referente a átomos de carbono dos grupos carbonila (200-165 ppm); a segunda região atribuída a átomos de carbono aromáticos e olefínicos (162-100 ppm); e a terceira região relativa a átomos de carbonos alifáticos (α , β , γ e metoxila).

As bandas de baixa intensidade identificadas em 101,6, 76-73 e 20,9 ppm, atribuídas a C-1 em unidades de xilose, C-2/C-3 e C-4 em unidades de xilose e CH_3 de grupos acetila ligados às xilanas, respectivamente, no espectro de RMN de ^{13}C , confirmam a baixa contaminação por carboidratos (1%, vide **TABELA 10**) na lignina isolada (CHEN e ROBERT, 1988).

A determinação da distribuição em massa molares e a massa molar média aparente da lignina de bagaço de cana extraída com dioxano:HCl 2 mol.L $^{-1}$ (9:1, v.v $^{-1}$) foi efetuada por GPC de seu derivado per-acetilado. A partir da curva de distribuição de massas molares obteve-se a média mássica (MM_M) e média numérica (MM_N) e a partir destes valores calculou-se também sua polidispersidade (PD). Os valores de MM_M e MM_N foram calculados a partir dos volumes de retenção de padrões monodispersos de poliestireno; portanto, os valores obtidos representam apenas valores relativos aos padrões de poliestireno empregados na curva de calibração, devendo, portanto, serem analisados de forma comparativa e não absoluta. Além disso, a MMA da lignina foi

calculada descontando a massa molar dos grupamentos acetila incorporados durante a etapa de acetilação.

TABELA 14. ATRIBUIÇÕES DOS SINAIS DE RMN DE ^{13}C PARA LIGNINA DIOXANO DO BAGAÇO DE CANA.

Atribuições ¹	δ em ppm/TMS	
	Bagaço	Literatura ²
C=O em cetonas não conjugadas	202	210-200
α -C=O em ArCOOH	166,4	165-167
C-4 em ArCOOH	162	162
Carbono aromático totais	102-162	102-162
C- α em cinamaldeído	152,6	152,6
C-3/C-5 em S β -O-4 e	152,1	152,1
C-2/C-6 em H benzoato	131	131
C- α e C- β em ArCH=CH-CH ₂ OH	128,4	128,3-129,3
C-H aromático	125,5-123,7	102-127
C-5 em G <u>e</u> e <u>ne</u>	115,8	115,2
C-2 em G	111,6	111,4
C-2/C em β - β	103,4	103,6
-COR alifáticos	73-95	58-95
C- α em β - β	85	85,3
C- β em G β -O-4 eritro	83,4	83,5
C- β e C- α em unidades β -O-4/ α -O-4	81,6	80-82
C- α em β -O-4 G e S eritro	72,6	72,5
C- α em β -O-4 G e S eritro ou S treó	71,7	71,8
C- α em β -O-4 G e S treó	71,4	71,4
C γ em β -5 e β -O-4 com α -C=O	63	63
C- γ H ₂ OH	62,7	58,4-64
C γ em unidade de álcool cinâmico	61,7	61,7
C γ em β -O-4 G e S treó e eritro	60,3	60,2
-OCH ₃ aromático em unidades G e S	55,8	55,7-55,9
-CH ₃ em -CH ₂ em cadeia alifática saturada	20-40	20-40

¹ G, guaiacila; S, sigingila; e,eterificados; ne, não eterificados;

² Dence e Lin (1992).

A massa molar aparente (MMA) da lignina e sua polidispersidade (PD) foi de 5465 \pm 734 e 2,9, respectivamente. Este valor foi próximo ao descrito por Marabezi (2009) para a lignina do bagaço de cana extraída com dioxano:HCl 2 mo.L⁻¹, que apresentaram

valores de massa molar média em massa (MMA_M) e em número (MMA_N) da ordem de 5476 e 1313 Da, respectivamente, com polidispersidade de 4,17. O valor de MMA_M desta lignina foi muito semelhante ao apresentado no presente trabalho. Entretanto, a polidispersidade da distribuição foi muito distinta nestes dois estudos.

4.2. PRÉ-TRATAMENTO POR EXPLOÇÃO A VAPOR DO BAGAÇO DE CANA

4.2.1. Recuperação total e composição química da fração BEV-IA

Os limites estabelecidos para as variáveis estudadas no pré-tratamento por explosão a vapor do bagaço de cana (**TABELA 2**) foram definidos a partir de estudos realizados anteriormente (PITARELO *et al.*, 2012, 2010). Na **TABELA 15** estão dispostos os rendimentos de recuperação da fração solúvel (BEV-SA) e insolúvel em água (BEV-IA) obtidos após o pré-tratamento a vapor, bem como a composição química das frações insolúveis (BEV-IA).

Em geral, os rendimentos totais de recuperação decresceram com o aumento da drasticidade do pré-tratamento (**TABELA 15**). As amostras submetidas a condições de pré-tratamento mais suaves resultaram em um maior rendimento percentual de fibras (BEV-IA), indicando uma menor solubilização do material lignocelulósico. Nestes experimentos, o maior rendimento de recuperação, em relação a massa seca do bagaço *in natura*, foi de 97,4%, que correspondeu a 79,3% em BEV-IA, 18,0% em BEV-SA e 3,3% em perdas por volatilização de eventuais sub-produtos da reação (hidroximetilfurfural, furfural, etc.). A condição que proporcionou este rendimento envolveu a autohidrólise do bagaço por 7,5 min a 195°C. Já o experimento que apresentou menor rendimento foi o denominado B13 (11,7 min, 195°C, 9,5 mg H_3PO_4). Nesta condição, foram obtidos 74,2% de recuperação total, sendo 53,4% na fração BEV-IA e 20,8% na fração BEV-SA, indicando que o aumento do tempo de exposição do material no reator e a presença de um catalisador ácido causa maior degradação do bagaço de cana e, com isso, maior concentração de subprodutos associados a reações de hidrólise e desidratação de pentoses e hexoses (hidroximetilfurfural, furfural, etc.) na fração BEV-SA.

Os pontos centrais do planejamento (B05-B07) geraram rendimentos médios de $81,95 \pm 1,30\%$ para pré-tratamentos realizados em triplicata. Para estes experimentos, os rendimentos das frações BEV-SA e BEV-IA foram de $20,03 \pm 1,95$ e $61,91 \pm 1,47$, respectivamente. Portanto, a boa repetibilidade obtida nestes experimentos demonstrou a confiabilidade dos procedimentos empregados neste estudo.

TABELA 15. RENDIMENTOS DE RECUPERAÇÃO TOTAL DO BAGAÇO APÓS O PRÉ-TRATAMENTO POR EXPLOSÃO A VAPOR E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA FRAÇÃO INSOLÚVEL EM ÁGUA.

Exp.	Massa (g)	Condição	Recuperação (%)		Composição Química BEV-IA (%)					
			BEV-SA ²	BEV-IA ²	AnGlc ³	AnXyl ⁴	AnAra ⁴	Acetila ⁴	Lignina ⁵	Cinzas
BIN ¹					37,96±0,13	18,89±0,06	3,34±0,02	3,49±0,02	20,80±0,26	6,53±0,20
B01	559,6	5 min, 180°C	12,2	76,2	47,70±0,23	7,23±0,15	2,56±0,08	1,02±0,01	31,14±0,81	3,09±0,21
B02	487,7	10 min, 180°C	15,2	70,5	48,89±0,12	4,05±0,01	0,94±0,01	0,64±0,01	32,96±2,12	5,87±0,11
B03	510,5	5 min, 210°C	14,0	69,2	50,89±0,46	nd	nd	nd	38,14±0,10	6,60±0,30
B04	500,2	10 min, 210°C	17,6	64,1	45,31±0,58	nd	nd	nd	37,73±0,09	6,36±0,97
B05	440,9	7,5 min, 195°C, 9,5 mg H ₃ PO ₄	20,0	60,8	51,14±1,43	2,64±0,01	nd	0,46±0,01	31,46±0,54	10,24±0,77
B06	440,6	7,5 min, 195°C, 9,5 mg H ₃ PO ₄	22,0	61,4	51,00±1,85	2,36±0,02	nd	0,44±0,02	33,53±0,54	9,73±0,87
B07	440,3	7,5 min, 195°C, 9,5 mg H ₃ PO ₄	18,1	63,6	51,40±1,03	2,34±0,02	nd	0,63±0,01	33,71±0,33	9,58±0,14
B08	452,8	5 min, 180°C, 19 mg H ₃ PO ₄	14,2	68,3	52,00±0,24	6,86±0,06	0,59±0,04	nd	31,03±0,79	6,93±0,41
B09	451,1	10 min, 180°C, 19 mg H ₃ PO ₄	15,9	62,7	55,26±0,55	4,16±0,01	0,36±0,01	nd	30,04±0,68	8,18±0,14
B10	460,3	5 min, 210°C, 19 mg H ₃ PO ₄	16,5	64,5	56,64±0,22	1,79±0,07	nd	nd	31,50±0,10	8,07±0,18
B11	449,9	10 min, 210°C, 19 mg H ₃ PO ₄	17,0	62,5	54,70±0,23	1,07±0,03	nd	nd	33,00±0,27	9,24±0,21
B12	443,0	3,3 min, 195°C, 9,5 mg H ₃ PO ₄	11,1	79,5	47,57±0,48	5,03±0,15	0,15±0,01	0,82±0,12	28,37±0,88	7,32±0,04
B13	443,0	11,7 min, 195°C, 9,5 mg H ₃ PO ₄	20,8	53,4	55,30±0,19	3,32±0,01	nd	0,55±0,03	29,42±0,12	6,70±0,23
B14	443,0	7,5 min, 170°C, 9,5 mg H ₃ PO ₄	16,1	73,5	44,75±0,87	8,46±0,33	0,33±0,03	nd	26,04±0,50	4,97±0,33
B15	443,0	7,5 min, 220°C, 9,5 mg H ₃ PO ₄	24,3	61,1	47,10±0,26	nd	nd	nd	35,40±1,20	3,05±0,33
B16	459,2	7,5 min, 195°C	18,0	79,3	47,44±0,73	nd	nd	nd	33,49±0,86	9,12±0,22
B17	443,0	7,5 min, 195°C, 25,5 mg H ₃ PO ₄	23,3	61,2	44,98±0,28	nd	nd	nd	35,35±1,47	10,61±0,69

¹ BIN: composição química do bagaço *in natura*.

² BEV-SA fração solúvel e BEV-IA insolúvel em água.

³ AnGlc: anidroglicose, presente como componente das β-(1→4)-D-glucanas (celulose).

⁴ Anxyl: anidroxilose; AnAra: anidroarabinose; Acetila: ácido acético; presentes como componentes das heteroxilanas (hemiceluloses).

⁵ Lignina insolúvel e lignina solúvel em ácido sulfúrico diluído.

As frações BEV-IA foram submetidas à análise pelo método de Sluiter *et al.* (2008) para determinação da sua composição química e os resultados obtidos estão descritos na **TABELA 15**. Os resultados mostraram que, independentemente da condição de pré-tratamento empregada, os teores de anidroglicose e lignina aumentaram em relação ao percentual obtido para o material *in natura* (BIN). Estes resultados podem ser atribuídos, principalmente, à remoção das hemiceluloses após o pré-tratamento, já que o percentual de hemiceluloses foi inferior quando comparado ao BIN. Os pré-tratamentos realizados em condições mais drásticas de temperatura, de tempo e de ácido fosfórico promoveram uma maior hidrólise das hemiceluloses, sendo que algumas condições levaram à remoção total deste componente da fração BEV-IA, como pode ser observado nos experimentos B03, B04, B15, B16 e B17. Diferentemente da celulose, as hemiceluloses apresentam baixo grau de polimerização (50-300) e não possuem regiões cristalinas, sendo mais suscetíveis à hidrólise ácida sob condições mais brandas.

Os teores de cinzas também foram superiores para os materiais pré-tratados em comparação com o material *in natura*, sendo que os únicos experimentos que apresentam teores de cinzas inferiores foram os experimentos B01, B02, B14 e B15.

Os extratos aquosos (fração BEV-SA) derivados do pré-tratamento por explosão a vapor foram submetidos à análise cromatográfica com o intuito de determinar suas respectivas composições químicas. A **FIGURA 20** apresenta o perfil cromatográfico típico dos extratos aquosos obtidos para os experimentos de autohidrólise (B16, 195°C, 7,5 min) e catálise fosfórica (B07, 195°C, 7,5 min e 9,5 g H₃PO₄.g⁻¹ de bagaço seco).

O experimento realizado na presença de ácido fosfórico (B07) acarretou uma diminuição da concentração de oligossacarídeos hidrossolúveis na fração BEV-SA (vide **FIGURA 20B**, B07), aumentando proporcionalmente a concentração de açúcares livres no extrato aquoso (**TABELA 16**).

Uma maior concentração de xilose foi observada em relação aos demais componentes, embora uma quantidade considerável de glucose também tenha sido identificada no meio. Os percentuais de xilose para os experimentos de autohidrólise (B01-B04) variaram de 3-5%, valores inferiores aos encontrados para os experimentos realizados com a impregnação ácida (B08-B11), que apresentaram teores em torno de 11-12% (**TABELA 16**). Tais resultados indicam que grande parte dos oligossacarídeos hidrossolúveis gerados no pré-tratamento catalisado por ácido foi hidrolisado a monossacarídeos.

A impregnação do bagaço de cana com ácido fosfórico aumentou em pelo menos três vezes a concentração de glucose na fração BEV-SA, quando comparada aos experimentos de autohidrólise (**TABELA 16**). Este comportamento foi atribuído à hidrólise de regiões mais acessíveis da celulose (regiões amorfas) e foi acompanhada por um

aumento substancial na presença de HMF no meio de reação (**TABELA 16**). A presença de catalisador ácido também proporcionou maior sacarificação das hemiceluloses e, por consequência, maior formação de furfural na fração BEV-SA.

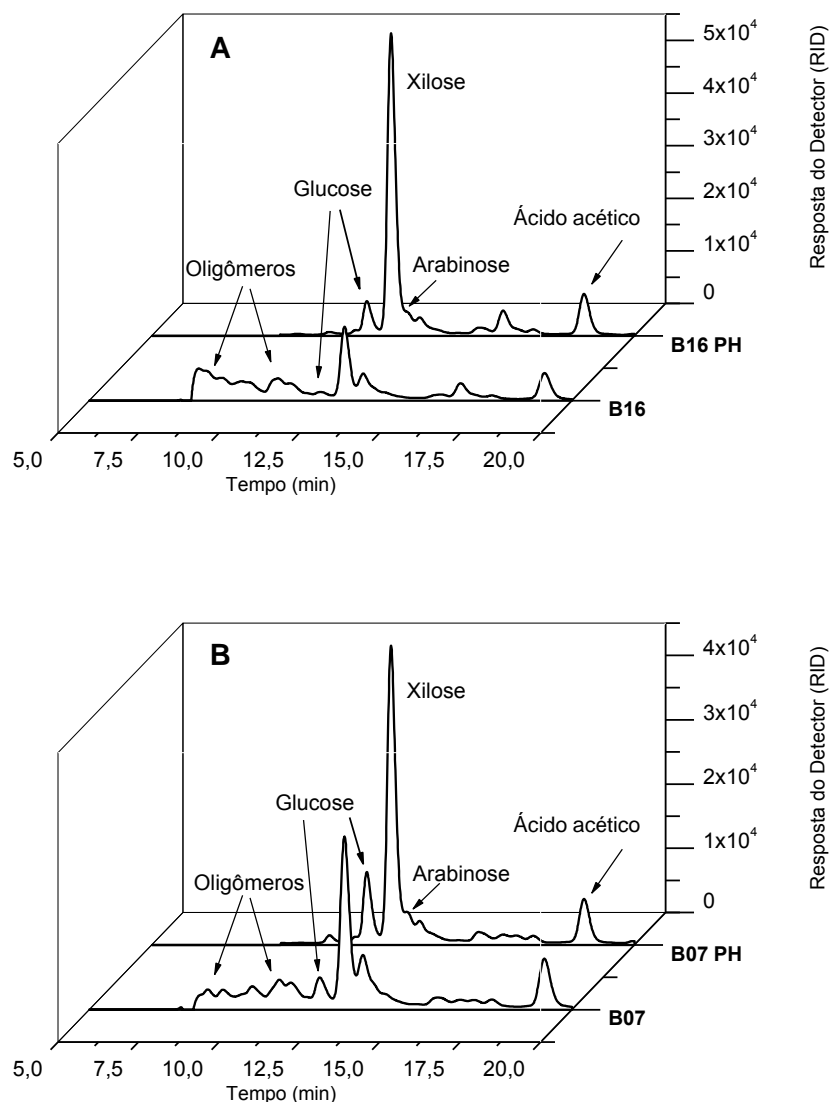


FIGURA 20. PERFIL CROMATOGRÁFICO DA FRAÇÃO SOLÚVEL OBTIDAS APÓS AO PRÉ-TRATAMENTO POR EXPLOSÃO A VAPOR DERIVADOS DOS EXPERIMENTOS DE (A) AUTOHIDRÓLISE (B16) E (B) CATALISADOS POR ÁCIDO FOSFÓRICO (B07) ANTES E DEPOIS DA PÓS-HIDRÓLISE (PH), OBTIDO COM DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO (RID).

Os resultados obtidos para os pontos axiais do planejamento (vide **TABELA 16**, experimentos B12-B17) permitiu avaliar o efeito das variáveis do pré-tratamento de forma isolada. Em geral, o aumento do tempo (3,3 para 11,7 min), da temperatura (170° para 220°C) e da concentração de ácido (0 para 25,5 mg de $H_3PO_4 \cdot g^{-1}$ de bagaço seco)

proporcionou maior percentual de hidrólise da celulose e, por consequência, maior concentração de HMF devido às reações de desidratação hexoses. Por outro lado, o teor de xilose e arabinose foi inferior para o experimento B13 (11,7 min) e superior para os experimentos B15 (220°C) e B17 (25,5 mg de $\text{H}_3\text{PO}_4 \cdot \text{g}^{-1}$ de bagaço seco).

TABELA 16. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA FRAÇÃO BEV-SA APÓS O PRÉ-TRATAMENTO.

<i>Exp.</i>	Furanos (g.L^{-1})		Composição Química (%)				Oligômeros ¹ (%)
	HMF	Furfural	AnGlc	AnXyl	AnAra	Acetila	
B01	0,21	2,96	0,79	2,95	1,53	1,23	95,92
B02	0,22	5,86	0,77	4,60	1,12	1,08	93,92
B03	1,01	6,16	0,89	3,75	2,76	1,57	94,00
B04	1,52	11,27	2,72	3,51	0,69	1,85	93,25
B05	0,70	9,67	1,90	9,73	1,45	1,80	87,14
B06	0,71	9,29	2,09	10,61	1,30	1,65	84,96
B07	0,78	10,73	2,49	10,68	1,28	1,59	86,08
B08	0,75	6,08	0,73	11,49	2,48	0,92	84,56
B09	0,72	8,66	2,10	11,52	2,28	1,46	82,96
B10	0,66	7,31	4,43	11,80	2,94	1,44	84,95
B11	1,29	8,55	3,54	12,19	2,40	1,99	81,72
B12	0,12	7,04	0,87	9,32	1,55	1,87	87,04
B13	0,98	8,17	2,18	8,87	1,16	2,96	84,82
B14	0,17	1,77	2,05	4,95	0,94	1,96	91,87
B15	3,44	12,82	3,59	8,27	1,23	2,00	88,40
B16	0,34	5,64	0,97	7,37	1,00	0,98	91,11
B17	0,91	10,88	3,83	12,12	2,63	0,91	85,17

¹ Expresso em relação a xilose antes e após a reação de pós-hidrólise na fração BEV-SA.

A concentração de HMF e furfural na fração BEV-SA (**TABELA 16**), como dito anteriormente, aumentou quando o pré-tratamento foi realizado em condições mais drásticas, indicando maiores índices de hidrólise e subsequente desidratação dos carboidratos presentes no bagaço de cana. Dentre as condições de pré-tratamento, a que proporcionou maior acúmulo destes subprodutos foi o experimento B15 (7,5 min, 220°C, 9,5 mg de $\text{H}_3\text{PO}_4 \cdot \text{g}^{-1}$ de bagaço seco), no qual foram produzidos 3,44 g.L^{-1} de HMF e 12,82 g.L^{-1} de furfural.

As análises cromatográficas dos extratos aquosos (BEV-SA) demonstraram que algumas amostras continham uma quantidade significativa de oligossacarídeos (**TABELA**

16), cuja quantificação não foi possível por falta de resolução cromatográfica. Com intuito de quantificar todos os carboidratos presentes nos extratos aquosos, na forma de açúcares livres, os extratos aquosos da primeira filtração foram submetidos a uma pós-hidrólise com ácido sulfúrico diluído e as amostras foram reanalisadas por CLAE. Os resultados obtidos com a pós-hidrólise foram utilizados para o fechamento do balanço de massas do processo de pré-tratamento. A **FIGURA 20** mostra o perfil obtido após a pós-hidrólise (PH) para o experimento B16 (autohidrólise) e B07 (catálise fosfórica) e as **TABELAS 17 e 18** apresentam o balanço de massas obtido para as frações BEV-SA e BEV-IA, bem como fechamento do balanço de massas do processo (BEV-SA + BEV-IA).

O balanço de massa para a autohidrólise do bagaço realizado a 180°C por 5 min (B01), indicou que 99,40% das glucanas originalmente presente no BIN foi recuperada nas frações BEV-SA (1,87%) e BEV-IA (97,57) do pré-tratamento. De modo análogo, a recuperação das glucanas para o experimento realizado nestas mesmas condições, na presença de impregnação ácida (180°C, 5 min, 19 mg de $\text{H}_3\text{PO}_4 \cdot \text{g}^{-1}$ de bagaço seca) (B08), atingiu 96,8% da glucose presente no BIN, sendo 3,64% na fração BEV-SA e 93,16% na fração BEV-IA.

Os percentuais de recuperação de glucose indicaram que a celulose não sofreu hidrólise em grande extensão em condições mais suaves de pré-tratamento, pois foi quase que totalmente recuperada na fração BEV-IA. Por outro lado, o pré-tratamento com ácido aumentou a concentração de glucose na fração BEV-SA em aproximadamente 50% em comparação com os experimentos de autohidrólise.

Os índices de recuperação de anidroxilose diminuíram consideravelmente na fração BEV-IA, principalmente nos experimentos realizados com catálise ácida, em que a anidroxilose foi recuperada em maior proporção na fração BEV-SA. Os maiores percentuais de recuperação de xilose foram obtidos para os experimentos B01 (87,99%) e B08 (89,83%), que apresentaram recuperação de 72,30 e 74,57% na fração BEV-SA, respectivamente. Por outro lado, a arabinose apresentou menores percentuais de recuperação que a glucose e a xilose, indicando que este monossacarídeo é mais suscetível à hidrólise e desidratação, sendo, provavelmente, a fonte mais importante para o acúmulo de furfural nas frações BEV-SA. No caso do ácido acético gerado pela desacetilação das hemiceluloses, o aumento da drasticidade do pré-tratamento resultou na desacetilação praticamente completa das hemiceluloses, sendo que este componente foi recuperado principalmente na fração BEV-SA. Entretanto, os resultados do balanço de massas total mostraram perdas que variaram de 12-50% deste componente após o pré-tratamento. Tal resultado pode ser fruto de reações de hidrólise e posterior volatilização, já que as temperaturas utilizadas no pré-tratamento foram superiores ao de seu ponto de ebulição (118°C).

TABELA 17. BALANÇO DE MASSAS OBTIDO PARA AS FRAÇÕES BEV-SA E BEV-IA APÓS AO PRÉ-TRATAMENTO A VAPOR.

Exp.	Massa (g)	BEV-SA ¹				BEV-IA ¹				
		AnGlc	AnXyl	AnAra	Acetila	AnGlc	AnXyl	AnAra	Acetila	Lignina
B01	559,6	1,83	72,30	30,64	49,77	97,57	15,69	40,15	17,23	97,44
B02	487,7	3,02	75,65	32,49	71,09	95,18	9,09	33,89	11,9	91,72
B03	510,5	7,95	62,55	53,75	88,30	91,25	nd	nd	nd	104,52
B04	500,2	7,08	52,01	41,05	68,02	79,72	nd	nd	nd	91,93
B05	440,9	7,20	75,66	38,58	65,02	89,80	7,43	nd	8,24	87,66
B06	440,6	7,04	70,53	36,16	60,25	92,76	6,56	nd	7,78	85,74
B07	440,3	8,32	76,71	36,82	63,46	90,28	7,00	nd	7,99	88,43
B08	452,8	3,64	74,57	16,90	66,05	93,16	15,26	24,83	nd	100,2
B09	451,1	4,64	67,61	20,48	55,42	90,26	14,23	14,08	nd	90,15
B10	460,3	9,89	78,39	49,01	63,98	81,31	5,43	nd	nd	83,78
B11	449,9	13,38	66,64	39,61	66,49	69,82	3,14	nd	nd	85,05
B12	443,0	3,21	71,91	43,16	40,78	95,09	16,44	5,60	17,06	81,32
B13	443,0	5,46	58,43	23,23	64,62	87,54	8,33	nd	8,79	71,36
B14	443,0	1,72	60,92	34,42	60,06	88,48	29,24	13,04	nd	78,94
B15	443,0	17,64	71,28	12,06	75,44	66,36	nd	nd	nd	89,25
B16	459,2	4,47	82,94	47,4	82,04	93,03	nd	nd	nd	82,83
B17	443,0	11,66	81,74	31,69	71,39	76,74	nd	nd	nd	84,88

¹ BEV-SA: fração solúvel em água após ao pré-tratamento a vapor; BEV-IA: fração insolúvel em água (fibras) após ao pré-tratamento.

TABELA 18. BALANÇO DE MASSAS TOTAL (BEV-SA E BEV-IA) OBTIDO APÓS O PRÉ-TRATAMENTO.

Exp.	Balanço de Massas Total (%)				
	AnGlc	AnXyl	AnAra	Acetila	Lignina
B01	99,4	87,99	70,79	67,00	97,44
B02	98,2	84,74	66,37	82,99	91,72
B03	99,2	62,55	53,75	88,30	104,52
B04	86,8	52,01	41,05	68,02	91,93
B05	97,0	83,09	38,58	73,26	87,66
B06	99,8	77,09	36,16	68,04	85,74
B07	98,6	83,71	36,82	71,45	88,43
B08	96,8	89,83	41,72	66,05	100,20
B09	94,9	81,85	34,56	55,42	90,15
B10	91,2	83,82	49,01	63,98	83,78
B11	83,2	69,68	39,61	66,49	85,05
B12	98,3	88,35	48,76	57,84	81,32
B13	93,0	66,76	23,23	73,40	71,36
B14	90,2	90,16	47,46	60,06	78,94
B15	84,0	71,28	12,06	75,44	89,25
B16	97,5	82,94	47,40	82,04	82,83
B17	88,4	81,74	31,69	71,39	84,88

Finalmente, os percentuais de recuperação da lignina na fração BEV-IA foram altos, indicando que este componente não sofreu hidrólise em grande extensão. Entretanto, alguns experimentos apresentaram percentuais de recuperação em torno de 90 a 100%, sugerindo que, nestas condições as reações de condensação preponderaram sobre as reações de hidrólise. Este tipo de reação gera materiais poliméricos que podem se comportar como lignina durante o procedimento de quantificação, como já relatado por outros autores para o pré-tratamento por explosão a vapor de diferentes materiais lignocelulósicos (EMMEL *et al.*, 2003; EXCOFFER *et al.*, 1991). Além disso, a recuperação de 100% deste composto seria impossível, já que a análise realizada por eletroforese capilar (EC) (vide item 2.4) mostrou a presença de compostos fenólicos nas frações BEV-SA, todos possivelmente oriundos da degradação da lignina durante o processo de pré-tratamento a vapor.

4.2.2. Modelagem Matemática

4.2.2.1. Efeito do pré-tratamento sob a recuperação total de celulose (glucose)

Com intuito de avaliar o efeito do pré-tratamento sob a hidrólise da celulose em relação às variáveis empregadas no planejamento fatorial (tempo, temperatura e impregnação ácida), foi proposto um modelo matemático utilizando como resposta a recuperação de anidroglicose total após ao pré-tratamento (**TABELA 18**). Maximizar a recuperação deste componente após ao pré-tratamento é de fundamental importância para a produção de etanol celulósico, pois dele depende a produção de açúcares fermentescíveis a partir da hidrólise enzimática.

O significado estatístico do modelo proposto foi avaliado por Análise de Variância (ANOVA) e os resultados obtidos estão apresentados na **TABELA 19**. O alto valor de F para a regressão (11,0) e o baixo valor da falta de ajuste (2,9) em relação ao F_{tab} demonstra que existe tendência no modelo proposto, fato confirmado pelos altos valores de R^2 e da máxima variância explicada (%Var), que foram de 94 e 83%, respectivamente. Estes valores foram considerados satisfatórios por se tratar de um sistema multivariado, onde os pontos axiais apresentam condições extremas de pré-tratamento, principalmente em relação o tempo (3,3 min) e a temperatura (220°C).

TABELA 19. TABELA DE ANOVA OBTIDA UTILIZANDO COMO RESPOSTA RECUPERAÇÃO DE ANIDROGLUCOSE (%) APÓS O PRÉ-TRATAMENTO.

<i>Fonte</i>	<i>SQ¹</i>	<i>GL¹</i>	<i>QM¹</i>	<i>F</i>	<i>F_{Tab}</i>
Regressão	466,6	9	51,8	11,0	3,68
Resíduos	33,0	7	4,7		
Falta de Ajuste	29,0	5	5,8	2,9	19,30
Erro Puro	3,9	2	2,0		
Total	499,5	16			

¹ SQ: soma dos quadrados; GL: graus de liberdade; QM: quadrados médio.

$R^2 = 0,9412$ e %Var = 0,8331

A partir dos efeitos estatísticos calculados em relação às condições de pré-tratamento, foi possível analisar os efeitos de primeira, segunda e terceira ordem sobre a recuperação total de anidroglicose. Os resultados obtidos nestes cálculos estão representados como gráfico de Pareto na **FIGURA 21**.

Todos os efeitos de primeira ordem foram significativos e apresentaram efeito negativo sobre a recuperação de anidroglicose, sendo que a temperatura (-7,58 p.p.) foi a variável mais significativa, seguida da impregnação ácida (-6,33 p.p.) e do tempo de reação (-5,53 p.p.), indicando que a celulose sofreu hidrólise em maior extensão quando

o pré-tratamento foi realizado em temperaturas superiores a 210°C, tempos acima de 7,5 min e na presença de ácido fosfórico, independentemente da concentração utilizada (9,5 ou 19 mg H₃PO₄). Neste sentido, os menores percentuais de recuperação foram obtidos para os experimentos B11 (10 min, 210°C, 19 mg H₃PO₄) e B15 (7,5 min, 220°C, 9,5 mg H₃PO₄), que proporcionaram aproximadamente 84% de recuperação de anidroglicose em relação ao material não tratado (BIN).

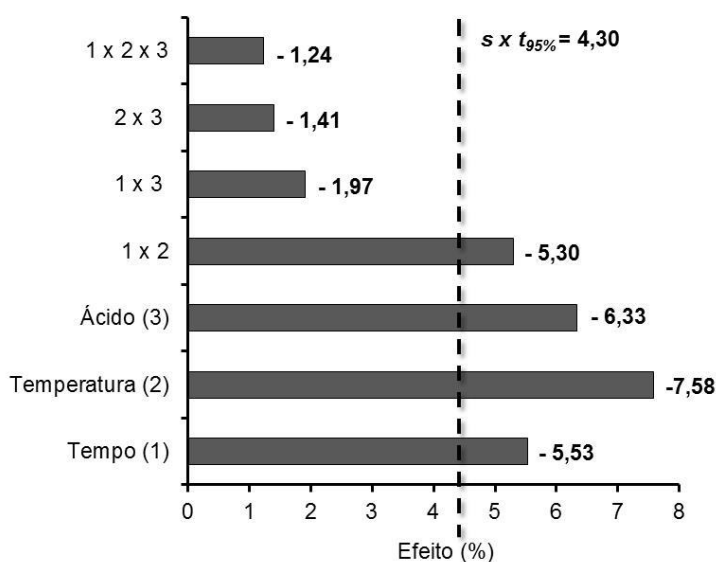


FIGURA 21. EFEITOS ESTATÍSTICOS PARA O RENDIMENTO DE RECUPERAÇÃO DA CELULOSE DURANTE O PRÉ-TRATAMENTO (GRÁFICO DE PARETO).

Os efeitos de primeira ordem podem ser melhor visualizados quando analisados os resultados dos pontos axiais. No caso da temperatura, o aumento de 170°C (B14) para 220°C (B15) diminuiu de 90 para 84 % a recuperação de anidroglicose após o pré-tratamento., enquanto que a impregnação ácida proporcionou um decréscimo de aproximadamente 9%, no percentual de recuperação de anidroglicose quando comparados os experimentos B16 (autohidrólise) e B17 (25,5 mg de H₃PO₄/g de bagaço). Já para o tempo de exposição do bagaço no reator, o aumento de 3,3 (B12) para 11,7 min (B13) reduziu estes percentuais de 98,3 para 93,0 %, respectivamente.

Dentre os efeitos de segunda ordem, apenas a interação entre o tempo e a temperatura foi estatisticamente significativo, influenciando negativamente em 5,30 p.p. a recuperação de anidroglicose nos substratos pré-tratados. Os resultados também mostraram que, em todas as condições onde o tempo passou de 5 para 10 min e a temperatura de 180 para 210°C, o rendimento em anidroglicose foi menor, como pode ser observado nos experimentos B04 (10 min, 210°C, 50% umidade) e B11 (10 min, 210°C, 19 mg H₃PO₄), cujos rendimentos foram de 86,8 e 83,2 %, respectivamente.

Os gráficos de contorno (curvas de nível) obtidas entre duas variáveis, mantendo a terceira variável fixa no ponto central do planejamento (195°C, 7,5 min e 9,5 mg de $\text{H}_3\text{PO}_4 \cdot \text{g}^{-1}$ de bagaço), estão representados na **FIGURA 22**.

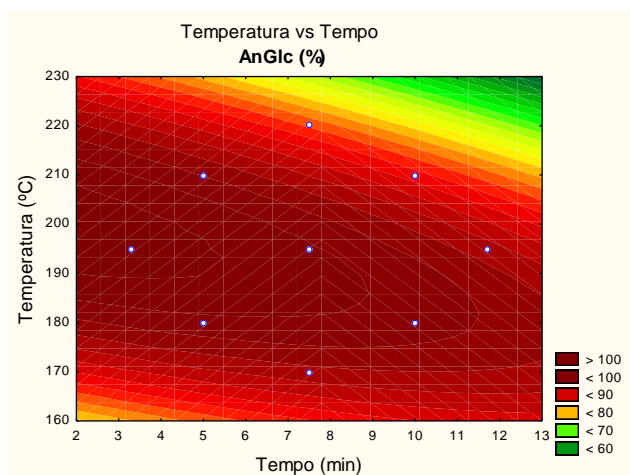
Fixando a concentração de ácido em 9,5 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ de H_3PO_4 , as curvas de nível indicam que, utilizando tempos de reação e temperaturas intermediárias, melhores rendimentos em anidroglicose foram obtidos (**FIGURA 22A**). De forma analoga, o gráfico de contorno do tempo *versus* impregnação ácida (**FIGURA 22B**) mostra que rendimentos otimizados podem ser obtidos empregando tempos e concentrações de ácido fosfórico mais baixos (vide a parte inferior esquerda do gráfico). A interação entre a temperatura e a impregnação ácida (**FIGURA 22C**) indica que pré-tratamentos mais drásticos (maiores temperaturas e concentrações ácidas) diminuem o percentual de recuperação de anidroglicose após o pré-tratamento.

Os maiores índices de recuperação foram obtidos quando os experimentos foram realizados em temperaturas menores (185 e 195°C), tempos de pré-tratamentos menores (5 e 7,5 min) e sem impregnação ácida (autohidrólise), ou quando a concentração de ácido fosfórico foi de 9,5 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ de bagaço. Estas condições proporcionaram, aproximadamente, 100% de recuperação das glucanas em relação ao material não tratado (BIN). A partir destes resultados foi possível determinar qual o intervalo, para cada uma das variáveis do processo, que permitiria maximizar a recuperação de anidroglicose. Com base nesta estratégia foram identificadas as condições de 195°C por 7,5 min e de 180°C por 5 min com carga de ácido fosfórico de 9,5 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ de bagaço seco para estas tecnologias de pré-tratamento, respectivamente.

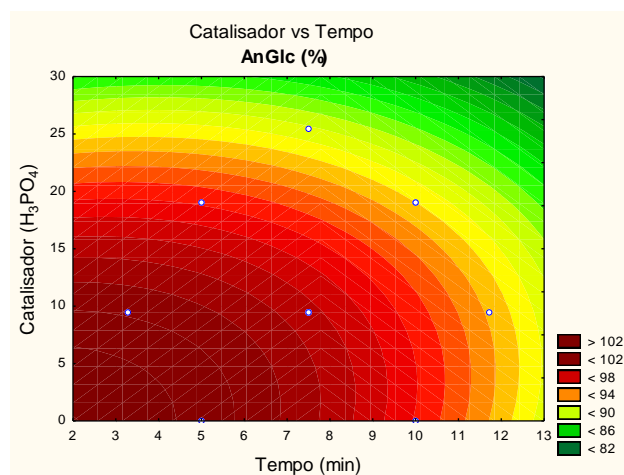
4.2.2.2. Efeito do pré-tratamento sob produção de furfural na fração BEV-SA

O furfural apresenta efeito tóxico sobre os microrganismos de fermentação, isto é, causa um retardamento no crescimento microbiano devido ao seu acúmulo na membrana celular (FONSECA *et al.*, 2011). Neste sentido, avaliar o efeito das variáveis empregadas no planejamento fatorial em relação à formação deste componente durante processo de pré-tratamento é de fundamental importância, principalmente quando a estratégia adotada na fermentação não envolva a lavagem do material pré-tratado com água.

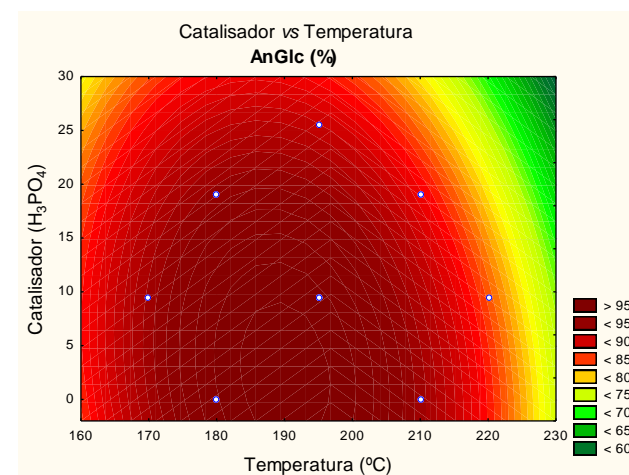
De forma análoga à recuperação de glucose (item 4.2.2.1.), foi proposto um modelo que utilizou como resposta a variação na concentração de furfural, determinada na fração BEV-SA após o pré-tratamento (**TABELA 16**), em relação às variáveis empregadas neste estudo (tempo, temperatura e impregnação ácida).



(A)



(B)



(C)

FIGURA 22. GRÁFICOS DE CONTORNO OBTIDOS PARA A RECUPERAÇÃO DE ANIDROGLUCOSE (CELULOSE) EM RELAÇÃO AS VARIÁVEIS EMPREGADAS NO PLANEJAMENTO FATORIAL. (A) TEMPERATURA VS TEMPO (CATALISADOR FIXO EM $9,5 \text{ mg.g}^{-1}$ DE BAGAÇO); (B) CATALISADOR VS TEMPO (TEMPERATURA FIXA EM 195°C) E (C) CATALISADOR VS TEMPERATURA (TEMPO FIXO EM 7,5 min).

A significância estatística do modelo proposto foi determinada por Análise de Variância (ANOVA) (**TABELA 20**). O alto valor de F para a regressão (7,412) e o baixo valor da falta de ajuste (0,001) em relação ao F_{tab} demonstra que existe tendência no modelo proposto, fato mais uma vez confirmado pelos altos valores de R^2 (91%) e da máxima variância explicada (%Var), 90%.

A formação de furfural durante o processo de pré-tratamento foi também avaliada a partir dos efeitos estatísticos calculados em relação às condições de pré-tratamento. Os efeitos primários e de interação entre as variáveis envolvidas no planejamento fatorial estão representados como gráfico de Pareto na **FIGURA 23**.

TABELA 20. TABELA DE ANOVA OBTIDA UTILIZANDO COMO RESPOSTA CONCENTRAÇÃO DE FURFURAL NA FRAÇÃO BEV-SA.

<i>Fonte</i>	<i>SQ¹</i>	<i>GL¹</i>	<i>QM¹</i>	<i>F</i>	<i>F_{Tab}</i>
Regressão	2003,6	9	222,6	7,412	3,677
Resíduos	210,4	7	30,0		
Falta de Ajuste	0,43	5	0,1	0,001	19,296
Erro Puro	209,8	2	104,9		
Total	2213,8	16			

¹ SQ: soma dos quadrados; GL: graus de liberdade; QM: quadrados médio.

$R^2 = 0,9050$ e %Var = 0,8953

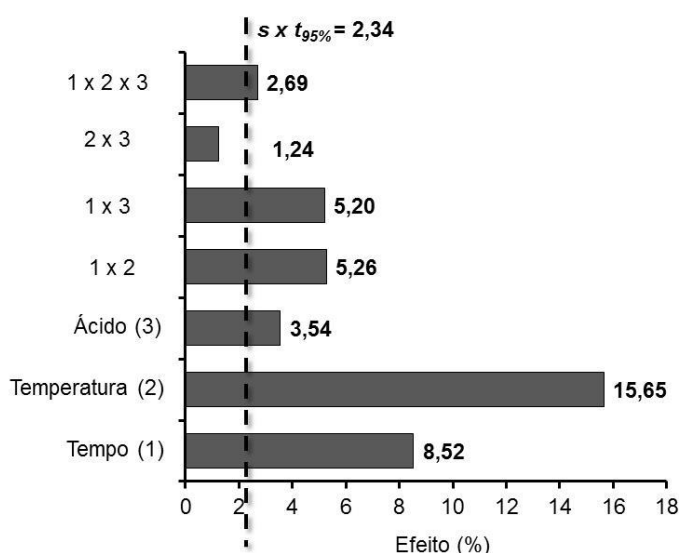


FIGURA 23. EFEITOS ESTATÍSTICOS PARA A PRODUÇÃO DE FURFURAL DURANTE O PRÉ-TRATAMENTO (GRÁFICO DE PARETO).

Os efeitos de primeira ordem foram todos significativos e apresentaram efeito positivo sobre o acúmulo de furfural nas frações BEV-SA. A temperatura (15,65 p.p.) foi a variável mais significativa, seguida do tempo (8,52 p.p.) e da impregnação ácida (3,54 p.p.) (**FIGURA 23**), indicando que as hemiceluloses, em condições mais drásticas de pré-tratamento, sofrem reações de hidrólise e desidratação em maior extensão. O efeito da temperatura pode ser melhor visualizado quando comparamos os experimentos B14 (7,5 min, 170°C, 9,5 mg $\text{H}_3\text{PO}_4 \cdot \text{g}^{-1}$ de bagaço seco) e B15 (7,5 min, 220°C, 9,5 mg $\text{H}_3\text{PO}_4 \cdot \text{g}^{-1}$ de bagaço seco), onde a concentração de furfural passou de 1,77 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (170°C) para 12,82 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (220°C). Já para o tempo de pré-tratamento, a concentração de furfural aumentou 1,13 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ quando o tempo passou de 3,3 min (B12) para 11,7 min (B13). Finalmente, o nível mais alto de impregnação ácida (B17) proporcionou um aumento de 5,24 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ na concentração de furfural, quando comparada ao experimento de autohidrólise (B16) (**TABELA 16**).

As interações do tempo (1) com a temperatura (2) e com a impregnação ácida (3) apresentaram efeitos de segunda ordem estatisticamente significativo, influenciando a desidratação de pentoses em 5,26 e 5,20 p.p., respectivamente. Para a interação entre o tempo e a temperatura em todas as condições onde o tempo passou de 5 para 10 min e a temperatura de 180 para 210°C, o acúmulo de furfural na fração BEV-SA foi maior, como observado nos experimentos B01 (5 min, 180°C) e B04 (10 min, 210°C) de autohidrólise e B08 (5 min, 180°C, 19 mg $\text{H}_3\text{PO}_4 \cdot \text{g}^{-1}$ de bagaço seco) e B11 (10 min, 210°C, 19 mg $\text{H}_3\text{PO}_4 \cdot \text{g}^{-1}$ de bagaço seco) de catálise fosfórica (**TABELA 16**). No caso da interação entre o tempo e a impregnação ácida, os resultados mostram que o aumento dessas variáveis favorece as reações de desidratação das pentoses e, por consequência, a um aumento na formação de furfural nas frações BEV-SA. Tal efeito pode ser melhor visualizado quando observamos a concentração de furfural para o experimento B01 (2,96 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) e B09 (8,66 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), que proporcionou um aumento em 5,7 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ de furfural, comparando o experimento de autohidrólise a 5 min (B01) e o experimento de catálise fosfórica a 10 min (B09).

A interação entre as três variáveis empregadas no pré-tratamento apresentaram interação positiva (2,69 p.p.), indicando que maiores concentrações de furfural na fração BEV-SA podem ser obtidas em condições mais drásticas de pré-tratamento. Embora, o efeito entre as três variáveis tenha sido muito próximo à estimativa do desvio padrão experimental (2,34), a existência de significado estatístico na interação ternária mostrou que a resposta é multivariada e que não possível interpretar a variância do sistema com base no comportamento de uma ou duas variáveis.

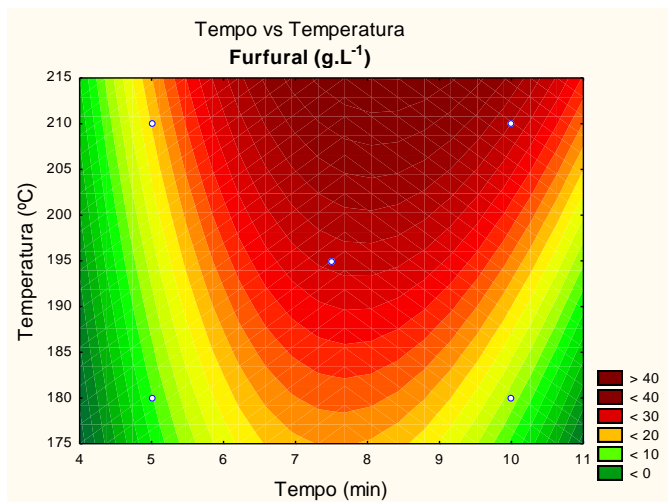
As curvas de nível, obtidas para a formação de furfural durante o processo de pré-tratamento por explosão a vapor, confirmam os resultados discutidos anteriormente, ou

seja, que em condições mais drásticas de pré-tratamento, as reações de desidratação são favorecidas, gerando maior concentração de furfural na fração BEV-SA. Neste sentido, a interação entre o tempo e a temperatura (**FIGURA 24A**) indica que maiores concentrações de furfural foram geradas quando o pré-tratamento foi realizado por tempos superiores a 5 min em temperaturas acima de 210°C. Fixando a temperatura em 195°C, os resultados mostraram a mesma tendência observada anteriormente para o tempo, independentemente da concentração de catalisador ácido empregado nos ensaios (**FIGURA 24B**). O gráfico de contorno da temperatura *versus* impregnação ácida (**FIGURA 24C**) mostraram a mesmas tendências observadas nas situações descritas acima. Considerando os resultados observados nas curvas de níveis para este modelo, a menor formação de furfural na fração BEV-SA é obtida na condição de 180°C por 5 min com ácido fosfórico a 9,5 mg.g⁻¹ de bagaço seco. Esta foi a mesma condição observada para os experimentos de catálise fosfórica para maximizar o rendimento de anidroglicose após ao pré-tratamento.

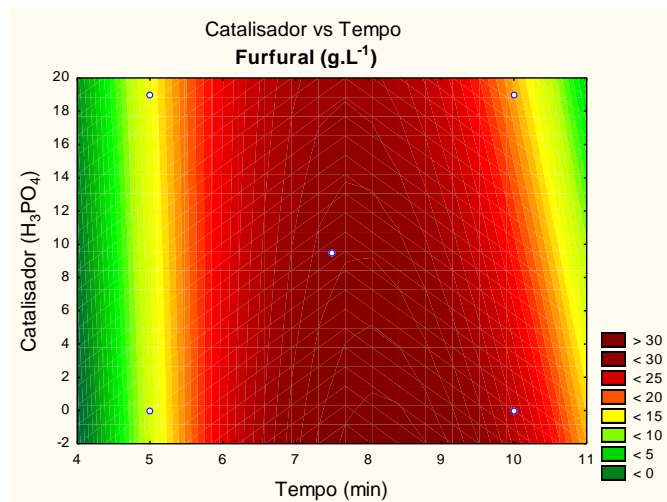
Nos dois modelos propostos, a temperatura foi a variável mais significativa, indicando que, em temperaturas superiores, as reações de hidrólise e desidratação das hemiceluloses são favorecidas e a remoção deste componente contribui diretamente à hidrólise de regiões mais acessíveis das glucanas (celulose). Por outro lado, o ácido fosfórico apresentou ser a segunda variável mais importante na recuperação de anidroglicose, já para a formação de furfural, esta só teve influência quando os experimentos foram realizados em tempos (7,5 e 10 min) e temperaturas elevadas (195 e 210°C). O efeito para o tempo de retenção do material reator mostrou que o aumento desta variável gera menor rendimento de recuperação de anidroglicose e maior produção de furfural. Assim, os dois modelos propostos indicaram tendências semelhantes, mesmo que as respostas utilizadas na validação não tenham uma correlação direta. Em suma, o aumento na recuperação de anidroglicose e a menor formação de furfural são obtidos em temperaturas, tempos e concentrações de ácido menores.

4.2.3. Quantificação de compostos fenólicos

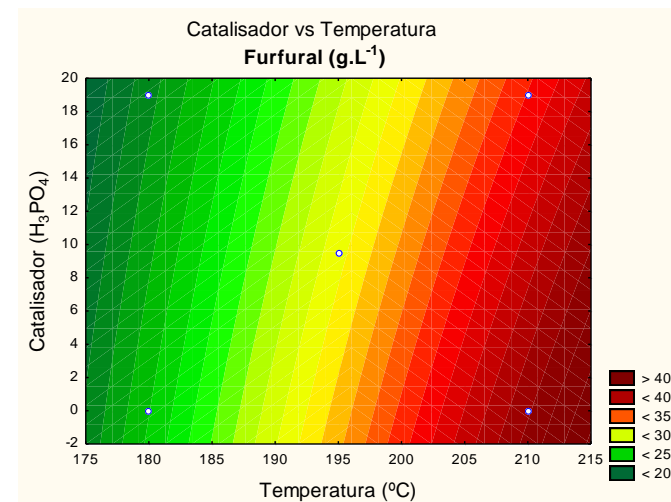
A quantificação dos compostos fenólicos foi realizada nas frações solúveis (BEV-SA) do pré-tratamento por eletroforese capilar (EC) e padronização externa dos nove analitos monitorados (*p*-hidroxibenzaldeído, ácido gálico, vanilina, ácido *p*-cumárico, ácido vanílico, ácido sirínico, ácido cafeico, ácido ferúlico e siringaldeído).



(A)



(B)



(C)

FIGURA 24. GRÁFICOS DE CONTORNO OBTIDOS PARA A CONCENTRAÇÃO DE FURFURAL EM RELAÇÃO AS VARIÁVEIS EMPREGADAS NO PLANEJAMENTO FATORIAL. (A) TEMPERATURA VS TEMPO (CATALISADOR FIXO EM 9,5 mg.g⁻¹ DE BAGAÇO); (B) CATALISADOR VS TEMPO (TEMPERATURA FIXA EM 195°C) E (C) CATALISADOR VS TEMPERATURA (TEMPO FIXO EM 7,5 min).

Os resultados obtidos por EC nas frações solúveis (BEV-SA) do pré-tratamento estão descritos na **TABELA 21**, enquanto que a **FIGURA 25** mostra um eletroferograma com o perfil típico apresentado em todas as amostras. A maior concentração de ácidos fenólicos na fração BEV-SA foi observada para os experimentos realizados em condições mais severas de pré-tratamento (B04, B10, B11, B16 e B17), sendo que o componente presente em maior concentração foi o ácido *p*-cumárico em todos os experimentos realizados neste estudo.

No total, foram detectados 6 compostos fenólicos (**FIGURA 25**), dos quais apenas dois estão presentes na cadeia de biossíntese da lignina: os ácidos *p*-cumárico e ferúlico. Esses ácidos são derivados, respectivamente, do *p*-cumaraldeído e do coniferaldeído, que são formados pela oxidação do álcool *p*-cumarílico e álcool coniferílico (**FIGURA 26**), respectivamente. Tais compostos atuam como precursores monoméricos da estrutura da lignina, juntamente com o álcool sinapílico.

Os demais compostos fenólicos (*p*-hidroxibenzaldeído, vanilina, siringaldeído e ácido vanílico) foram formados a partir de reações de hidrólise, de clivagem homolítica ou de oxidação de subestruturas da lignina. O *p*-hidroxibenzaldeído, a vanilina e o siringaldeído são provavelmente formados pela clivagem de ligações éter entre benzaldeídos terminais e a macromolécula de lignina ou a partir das reações hidrolíticas de ligações β -O-4, seguido por oxidação do carbono α do aldeído aromático (HISHYAMA e SUDO, 1992). Por outro lado, o ácido vanílico pode ser formado através da hidrólise ácida das ligações β -O-4 (enlace aril éter) da lignina de gramíneas (DENCE e LIN, 2002).

Na **FIGURA 25**, as bandas de eluição *d1 e *d2 não foram identificadas dentre os padrões e não encontraram correspondência na biblioteca de espectros no ultravioleta disponível no equipamento. O composto *d1 mostrou ser altamente polar, pois permaneceu na fração aquosa quando submetido uma extração em fase sólida (cartucho C18-SPE) com metanol. Já o composto *d2 foi identificado, com probabilidade de 92%, como sendo o ácido *p*-cumárico. No entanto, a diferença no espectro no ultravioleta (UV) a 200 nm deste composto, em relação ao padrão, pode estar relacionada à presença de um fragmento de carboidrato covalentemente ligado a ele, mudando assim a sua mobilidade iônica e seu perfil no UV.

TABELA 21. CONCENTRAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS PRESENTES NAS FRAÇÕES BEV-SA APÓS AO PRÉ-TRATAMENTO.

Exp.	Condição	Volume* (L)	Concentração (g.L ⁻¹)					
			Siringaldeído	Vanilina	Ácido ferúlico	<i>p</i> -Hidro-benzaldeído	Ácido <i>p</i> -cumárico	Ácido vanílico
B01	5 min, 180°C	2,6	0,06	0,03	0,03	0,09	0,37	0,04
B02	10 min, 180°C	2,3	0,04	0,05	0,07	0,13	0,38	0,04
B03	5 min, 210°C	2,7	0,02	0,02	0,02	0,06	0,29	0,02
B04	10 min, 210°C	3,4	0,17	0,09	0,08	0,25	1,03	0,11
PC05	7,5 min, 195°C, 9,5 mg H ₃ PO ₄	3,1	0,05	0,06	0,08	0,14	0,14	0,05
PC06	7,5 min, 195°C, 9,5 mg H ₃ PO ₄	2,4	0,05	0,06	0,08	0,14	0,24	0,05
PC07	7,5 min, 195°C, 9,5 mg H ₃ PO ₄	2,8	0,04	0,04	0,06	0,17	0,22	0,04
B08	5 min, 180°C, 19 mg H ₃ PO ₄	1,3	0,18	0,18	0,28	0,28	1,70	0,21
B09	10 min, 180°C, 19 mg H ₃ PO ₄	1,0	0,13	0,14	0,15	0,15	0,84	0,08
B10	5 min, 210°C, 19 mg H ₃ PO ₄	2,7	0,12	0,23	0,15	0,27	1,13	0,08
B11	10 min, 210°C, 19 mg H ₃ PO ₄	3,0	0,12	0,21	0,19	0,28	0,82	0,07
B12	3,3 min, 195°C, 9,5 mg H ₃ PO ₄	1,0	0,15	0,18	0,27	0,39	1,84	0,11
B13	11,7 min, 195°C, 9,5 mg H ₃ PO ₄	1,8	0,17	0,38	0,20	0,39	1,07	0,14
B14	7,5 min, 170°C, 9,5 mg H ₃ PO ₄	1,1	0,23	0,24	0,36	0,41	0,95	0,20
B15	7,5 min, 220°C, 9,5 mg H ₃ PO ₄	2,6	0,18	0,19	0,28	0,32	0,74	0,16
B16	7,5 min, 195°C	3,7	0,12	0,18	0,18	0,34	1,03	0,00
B17	7,5 min, 195°C, 25,5 mg H ₃ PO ₄	3,5	0,14	0,23	0,17	0,23	0,79	0,15

* Volume da fração solúvel obtida após a filtração do bagaço pré-tratado por explosão a vapor.

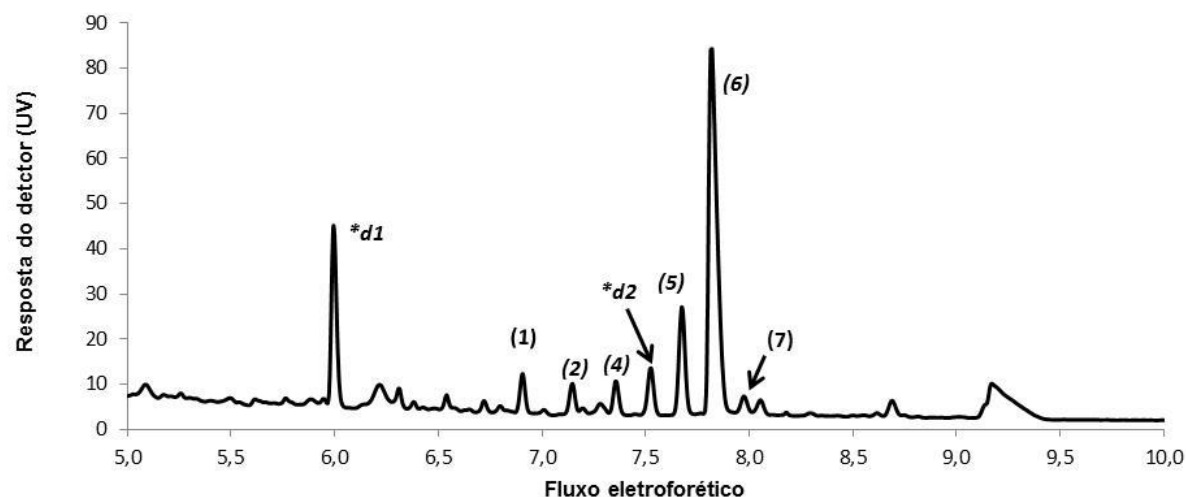


FIGURA 25. ELETROFEROGRAMA TÍPICO DE UMA AMOSTRA DE BEV-SA EM 200 nm, CONTENDO (1) SIRINGALDEÍDO, (2) VANILINA, (4) ÁCIDO FERÚLICO, (5) *p*-HIDROXIBENZALDEÍDO, (6) ÁCIDO *p*-CUMÁRICO E (7) ÁCIDO VANÍLICO, ONDE *d1 E *d2 CORRESPONDEM A COMPOSTOS NÃO IDENTIFICADOS.

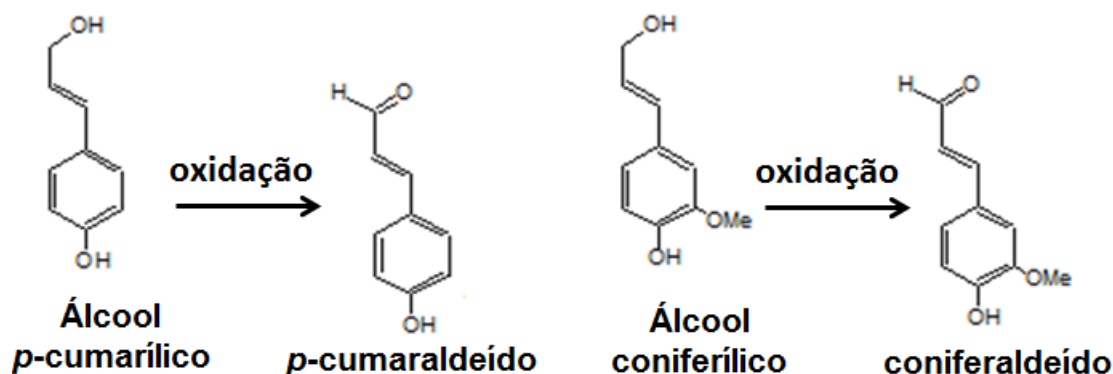


FIGURA 26. OXIDAÇÃO DOS MONOLIGNÓIS PRESENTES NA CADEIA DE BIOSÍNTESE DA LIGNINA.

Os trabalhos publicados até o momento sobre a caracterização de compostos fenólicos para o bagaço de cana pré-tratados por explosão a vapor são, geralmente, realizados por CLAE ou por cromatografia de fase gasosa com detecção seletiva de massas (CG-EM). Nestes trabalhos, os principais componentes identificados até o momento foram: *p*-hidroxibenzaldeído, ácido *p*-hidroxibenzóico, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico, siringaldeído, vanilina, ácido vanílico e ácido siringílico (CUNHA *et al.*, 2001; MATTOS e SILVA, 2001). Comparando estes dados com o presente trabalho, apenas os ácidos siringílico e *p*-hidroxibenzóico não foram identificados, donde se pressupõe que esses compostos estão presentes em concentrações muito baixas e não tenha sido possível detectá-los po eletroforese capilar.

4.3. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO BAGAÇO DE CANA PRÉ-TRATADO A VAPOR

Os substratos pré-tratados e lavados com água (BEV-IA) foram submetidos a uma condição padrão de hidrólise enzimática (8% substrato, 150 rpm, 30 mg de enzima.g⁻¹ de substrato, 96 h) para avaliar a sua suscetibilidade à conversão em açúcares livres pela ação das enzimas. Os resultados obtidos estão descritos na **TABELA 22**.

TABELA 22. CONVERSÃO EM EQUIVALENTES DE GLUCOSE APÓS A HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DOS SUBSTRATO PRÉ-TRATADOS E LAVADOS COM ÁGUA.

Exp.	Equivalentes de Glucose (EqGlc) (%)							
	1 h	3 h	6 h	12 h	24 h	48 h	72 h	96 h
B01	9,06	15,14	21,08	32,69	44,65	55,09	63,32	65,81
B02	9,21	17,21	24,74	35,63	50,13	65,02	70,45	75,09
B03	6,99	11,41	16,40	25,51	40,18	54,62	66,49	71,14
B04	10,32	13,27	19,73	31,02	55,46	69,83	82,35	89,63
B05	8,70	12,13	16,92	29,20	42,14	53,04	67,98	75,46
B06	9,11	12,53	17,78	28,99	42,64	52,25	68,68	74,40
B07	9,40	12,56	17,72	30,07	41,54	49,27	65,39	75,36
B08	8,25	12,95	18,67	27,81	48,89	56,42	65,32	83,65
B09	9,64	11,60	16,57	25,13	40,55	52,70	64,53	72,63
B10	5,04	8,37	12,00	18,06	34,33	48,95	56,22	67,47
B11	4,42	7,78	12,64	20,31	38,72	47,62	61,43	71,25
B12	10,13	14,11	20,01	37,42	49,44	55,23	70,11	73,17
B13	8,53	11,03	17,59	30,04	39,76	53,85	63,13	67,89
B14	9,82	13,32	18,01	30,29	37,43	42,16	50,14	50,34
B15	6,94	12,57	17,71	32,33	52,04	74,42	89,39	97,83
B16	9,91	14,31	17,63	39,85	55,18	66,56	86,46	86,62
B17	9,25	12,43	18,29	32,75	46,34	54,79	68,79	71,80

A **TABELA 22** mostra que os substratos obtidos apresentaram boa conversão à anidroglicose utilizando uma consistência relativamente alta de sólidos totais (8%) e uma baixa carga enzimática de 30 mg de enzima.g⁻¹ de substrato. A preparação enzimática Cellic CTec[®] 2 (Novozymes), empregada nos ensaios de hidrólise enzimática, além de conter uma mistura completa de celulases, não exigiu suplementação com atividade β -glucosidásica exógena, permitindo que a sacarificação fosse realizada com um único complexo enzimático. Este comportamento é diferente do emprego da preparação

celulásica Celuclast 1.5L (Novozymes) que precisa ser suplementada com Novozym 188 (β -glucosidases) para que celulose seja eficientemente convertida em açúcares livres.

Para os experimentos realizados com ácido fosfórico (B8-B09), o aumento da temperatura e do tempo de exposição no reator não influenciaram a hidrólise das fibras de celulose tanto quanto observado nos experimentos de autohidrólise (B01-B05). Os resultados obtidos para estes experimentos variaram de 67 a 74% de hidrólise da celulose em 96 h de reação. O maior percentual de sacarificação foi obtido para o experimento B08 (180°C, 5 min, 9,5 mg $\text{H}_3\text{PO}_4 \cdot \text{g}^{-1}$ de bagaço), realizado com menor temperatura e tempo de exposição do material no reator. O percentual de conversão para este experimento foi de 74% em EqGlc em 96 horas de reação. Entretanto, este resultado foi inferior ao obtido para o experimento de autohidrólise (B04), que apresentou rendimento de sacarificação superior em 16 pontos percentuais. Tal diferença pode ser atribuída à condição mais drástica de pré-tratamento no experimento de autohidrólise (B04), que proporcionou a remoção total das hemiceluloses, já que este fato não foi observado para o experimento de catálise fosfórica (B08), que resultou na manutenção de um percentual de aproximadamente 7,5% de hemiceluloses nas fibras (vide **TABELA 15**).

Em geral, os melhores rendimentos de sacarificação para a autohidrólise do bagaço de cana foram obtidos quando o pré-tratamento foi realizado em condições mais drásticas (210°C por 10 min). Em contrapartida, para a catálise fosfórica, os maiores índices de conversão foram obtidos quando menores temperaturas e tempos de retenção do material no reator foram empregados (180°C por 5 min). Neste sentido, devido aos problemas inerentes ao emprego de temperaturas da ordem de 210°C, a catálise fosfórica se desdobra como uma opção mais atraente do que a autohidrólise por produzir substratos com boa susceptibilidade à hidrólise enzimática sob menores temperaturas de pré-tratamento (180°C).

Em linhas gerais, o bagaço de cana foi pré-tratado com sucesso por explosão a vapor, cujo foco principal era produzir substratos altamente acessíveis para a hidrólise enzimática com as melhores recuperações possíveis de açúcares fermentescíveis para a etapa de fermentação (principalmente anidroglicose). Neste sentido, a escolha dos melhores substratos para a produção de etanol celulósico foi baseada no rendimento total de sacarificação. Nesta estratégia, além de levar em conta a acessibilidade dos substratos às enzimas, que é dada pelos rendimentos de hidrólise enzimática da celulose em celobiose e anidroglicose (EqGlc) (**TABELA 22**), foi levado em conta o percentual de recuperação de anidroglicose (celulose) após a etapa de pré-tratamento (**TABELA 17**).

Os melhores rendimentos de hidrólise enzimática, em relação o percentual de celulose presente nos substratos após o pré-tratamento (**TABELA 15**), foram obtidos

para os experimentos realizados sob condições mais drásticas. Neste sentido, o melhor resultado de sacarificação foi obtido para o experimento B15 (9,5 min, 220°C, 9,5 mg $\text{H}_3\text{PO}_4 \cdot \text{g}^{-1}$ de bagaço seco), que apresentou 97,83% de conversão da glucanas (celulose) em glucose e celobiose (EqGlc) em 96 h de reação. Entretanto, ao ser considerado o percentual de recuperação de celulose após o pré-tratamento na fração BEV-IA (**TABELA 17**), o rendimento final em EqGlc diminuiu para 64,92%, já que, sob condições mais drásticas, parte dos carboidratos liberados por hidrólise ácida são envolvidos em reações de desidratação, diminuindo seu rendimento de recuperação após o pré-tratamento. Estes resultados revelam que este substrato, apesar de apresentar alta acessibilidade enzimática, possui menor potencial para a produção de etanol celulósico a partir da fermentação da glucose.

Considerando a sacarificação total obtida para as diferentes condições de pré-tratamento, os substratos escolhidos para serem testados na etapa de fermentação foram correspondentes aos experimentos B08 (5 min, 180°C, 19 mg $\text{H}_3\text{PO}_4 \cdot \text{g}^{-1}$ de bagaço seco) e B16 (7,5 min, 195 °C), que proporcionaram rendimentos totais de 77,93 e 80,58% de anidrogucose, respectivamente. Além dessas condições, a triplicata do ponto central (B05-B07) também foi submetida à fermentação com intuito de avaliar a repetibilidade obtida nestes experimentos, sendo que a conversão em glucose e celobiose foi de $75,07 \pm 0,58\%$ (**TABELA 22**) e de rendimento total de sacarificação foi de $68,27 \pm 0,66\%$ nestas condições.

4.4. FERMENTAÇÃO DAS CONDIÇÕES ÓTIMAS DE PRÉ-TRATAMENTO

4.4.1. Hidrólise enzimática dos substratos selecionados

Nesta etapa, a hidrólise enzimática dos substratos selecionados foi realizada com uma concentração de 12% de substrato ($\text{m} \cdot \text{v}^{-1}$) para se obter um hidrolisado mais rico em açúcares fermentescíveis. Os ensaios foram realizados por 96 h de reação empregando carga enzimática de 62,5 mg de enzima $\cdot \text{g}^{-1}$ de substrato seco (Cellic CTec 2). No término das 96 h de reação, o meio reacional foi centrifugado e a fração líquida (hidrolisado enzimático) foi submetida ao processo de SHF (item 4.4.3.).

Os ensaios de hidrólise enzimática foram realizados com substratos derivados dos experimentos B08 e B16 após terem sido lavados com água. Esta medida foi feita para garantir que a susceptibilidade da celulose à hidrólise seria medida na ausência de quaisquer fatores negativos (inibidores) que poderiam advir do pré-tratamento, principalmente na forma de carboidratos e ácidos orgânicos (XIMENES *et al.*, 2010). Já os experimentos de hidrólise enzimática para o ponto central do planejamento (B05-B07)

foram realizados nos substratos lavados (BEV-IA) e não lavados (BEV-SL) com água para avaliar o efeito dos compostos solúveis, produzidos durante o pré-tratamento, sobre a eficiência de sacarificação enzimática da celulose.

A **TABELA 23** mostra o percentual de conversão dos substratos em relação ao teor de celulose inicial (**TABELA 14**). O substrato produzido no experimento B16 mostrou ser o mais acessível à hidrólise dentre os substratos testados, pois praticamente 100% da celulose foi hidrolisada em 96 h de reação. Este fato pode ser atribuído à total remoção das hemiceluloses durante o pré-tratamento, já que há evidências de que a remoção destas durante o pré-tratamento aumenta a acessibilidade das enzimas à celulose (BURA *et al.*, 2009). Entretanto, outros fatores também podem ter contribuído para o aumento da susceptibilidade da celulose à hidrólise, como variações no teor de lignina, no tamanho das partículas e sua área superficial de contato e na cristalinidade da celulose (ROMANI *et al.*, 2010; VARNAL *et al.*, 2010).

TABELA 23. EQUIVALENTES DE GLUCOSE LIBERADA DURANTE A HIDRÓLISE ENZIMÁTICA.

Tempo (h)	Equivalentes de glucose (%)							
	B08	B16	B05	B06	B07	B05SL ¹	B06SL ¹	B07SL ¹
1	9,62	9,26	10,67	9,59	10,73	5,07	5,24	5,04
3	20,60	22,77	18,86	18,62	18,87	7,79	10,57	9,01
6	28,07	27,42	29,98	28,07	28,35	13,65	15,40	15,25
12	33,73	43,17	36,15	42,44	37,26	23,43	21,26	22,78
24	45,71	57,93	47,14	52,27	49,08	26,43	24,89	28,65
48	50,42	64,86	62,87	66,37	67,30	32,48	33,99	36,45
72	71,60	77,00	72,53	81,49	80,33	41,27	41,39	43,18
96	79,06	97,44	81,46	84,92	82,06	45,96	43,87	45,97

¹B05-B07SL: substratos não lavados

Os percentuais de celulose convertida em celobiose e glucose para os experimentos BEV-IA foram superiores aos BEV-SL, indicando que os compostos solúveis produzidos durante o processo de pré-tratamento inibiram a ação das enzimas celulolíticas. A literatura relata a formação de alguns inibidores enzimáticos importantes durante o pré-tratamento por explosão a vapor, como, por exemplo, furfural, hidroximetilfurfural e compostos fenólicos, que são oriundos da desidratação de pentoses e hexoses e da hidrólise e modificação química da lignina durante o processo (HENDRIKS e ZEEMAN, 2009; XIMENES *et al.*, 2010). Compostos inibidores como estes podem ser liberados no meio reacional durante a hidrólise enzimática, levando à perda de

eficiência da sacarificação (MOSIER *et al.*, 2005; TENGBORD *et al.*, 2001; PALMQVIST *et al.*, 1996). Estudos realizados por Ximenes *et al.* (2010) mostraram que os compostos fenólicos como vanilina, siringaldeído, ácido *trans*-cinâmico e *p*-hidroxibenzaldeído também inibem a ação de celulases e β -glucosidases sobre substratos celulósicos. Uma concentração de 4 mg de vanilina para 1 mg de proteína (0,5 FPU) reduziu em 50% a hidrólise da celulose. Por outro lado, os resultados mostraram que as β -glucosidases de *Trichoderma reesei* e *Aspergillus niger* são mais tolerantes aos compostos fenólicos, sendo necessárias concentrações de 10 e 100 vezes maiores para obter os mesmos níveis de inibição observados para as celulases.

Estudos realizados por HOLTZAPPLE *et al.* (1990) para determinar o efeito sobre a atividade celulásica de compostos fenólicos oriundos do pré-tratamento por explosão a vapor demonstraram que a inibição causada por fenóis e polifenóis é muito maior do que a causada pela glucose e pela celobiose, que por muito tempo foram considerados os principais inibidores do processo de hidrólise enzimática. Ximenes *et al.* (2011) investigaram o efeito de ácido tânico, ácido gálico, ácido hidroxicinâmico, ácido *p*-hidroxibenzóico, ácido ferúlico, ácido *p*-cumárico, ácido sinápico, siringaldeído e vanilina sobre a inibição e desativação de preparações celulásicas (Spezyme CP, de *Trichoderma reesei*) e β -glucosidásicas (Novozym 188, de *Aspergillus niger*). Os ensaios de inibição para a Spezyme CP (0,32 mg.mL⁻¹) mostraram que o ácido tânico (2 mg.mL⁻¹) inibe 100% da atividade celulásica total (FPAse). Já os demais compostos fenólicos apresentaram pouco ou nenhum efeito inibitório sobre esta atividade. Por outro lado, os ensaios de inibição utilizando Novozym 188 (3,4 mg.mL⁻¹) mostraram que as β -glucosidases de *A. Niger* e *T. reesei* são desativadas de 20-80% na presença de ácido tânico, ácido gálico, ácido hidroxicinâmico, ácido *p*-hidroxibenzóico, singaldeído e vanilina (5 mg.mL⁻¹). Além disso, as β -glucosidases de *T. reesei* e *A. Niger* apresentaram desativação de aproximadamente 50% e 10% na presença do ácido *p*-cumárico, respectivamente.

Ensaio de hidrólise enzimática (substrato 100 g.L⁻¹, 50 FPU *T. viride*, 140 rpm, 48 h) para o bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor (224°C, 5 min) lavado e não lavado com água apresentaram resultados de sacarificação de 94,9% e 73,7%, respectivamente (SASAKI *et al.*, 2012). Tal resultado apresentou um decréscimo de 21% quando o material foi hidrolisado na presença dos compostos solúveis gerados durante o pré-tratamento. Segundo os autores, a presença de derivados da lignina de baixa massa molar (dados não apresentados pelos autores) e de desidratação de carboidratos (HMF e furfural) limitaram o acesso das enzimas ao substrato. A concentração de HMF e furfural foi de 16,7 e 3,5 mg.g⁻¹ de substrato, respectivamente, o que equivale a uma concentração de 1,67 e 0,35 g.L⁻¹. No presente trabalho, a inibição das enzimas pelos compostos hidrosolúveis gerados no ponto central do planejamento (B05-B07) foi de

aproximadamente 30%, quando comparamos o material lavado ($65,51 \pm 2,34\%$) e não lavado com água ($34,31 \pm 2,00\%$) em 48 h de reação (**TABELA 23**). Esse resultado pode ser justificado pelas maiores concentrações de HMF ($0,73 \pm 0,04 \text{ g.L}^{-1}$) e furfural ($9,90 \pm 0,75 \text{ g.L}^{-1}$) que foram detectadas nos hidrolisados do bagaço de cana pré-tratado a vapor (**TABELA 15**).

Os produtos de hidrólise das hemiceluloses, formados durante o processo de pré-tratamento (xilose, arabinose, xilo-oligômeros, ácido glucurônico), também já foram descritos na literatura como inibidores das celulasas (QING *et al.*, 2010; XIAO *et al.*, 2004). Estudos realizados por Qing *et al.* (2010) para avaliar o efeito de xilo-oligômeros (DP 2-30) sobre a hidrólise enzimática de celulose microcristalina (Avicel PH101), utilizando preparações celulásicas (Spezyme CP, $5 \text{ FPU} \cdot \text{g}^{-1}$ de glucana) e β -glucosidásicas (Novozym 188, $10 \text{ CBU} \cdot \text{g}^{-1}$ de glucana), mostraram que os xilo-oligômeros presentes no meio a uma concentração de $12,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ reduziram as taxas de hidrólise da Avicel em 82%, e que a presença de xilose e xilanas em concentrações baixas ($1,67 \text{ mg.mL}^{-1}$) não apresentaram efeito inibitório considerável sobre a sacarificação. No entanto, estes resultados não são relevantes quando o substrato a ser hidrolisado apresenta baixo teor de hemiceluloses e é submetido a uma etapa de lavagem após o pré-tratamento, já que este procedimento remove os compostos gerados pela hidrólise das hemiceluloses (xilose, arabinose e xilo-oligômeros).

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que os compostos presentes nas frações BEV-SA, produzidos durante o pré-tratamento por explosão a vapor do bagaço de cana, diminuem a eficiência com que a celulose é hidrolisada pela ação sinérgica das celulasas. No entanto, as concentrações dos compostos fenólicos obtidos neste trabalho (**TABELA 21**) foram inferiores aos relatados na literatura como inibitórios para estas enzimas (XIMENES *et al.*, 2011, 2010). Por outro lado, a menor conversão da celulose, observada nos substratos pré-tratados não lavados, pode ter sido causada pelos produtos de hidrólise das hemiceluloses, já que a literatura descreve que estes componentes podem inibir a ação do complexo celulolítico. Entretanto, a natureza destes compostos não foi investigada no presente trabalho, impossibilitando uma comparação direta com os dados disponíveis na literatura.

4.4.2. Determinação da temperatura ótima para os ensaios de fermentação

Para a escolha da temperatura em que seriam realizados os experimentos de SHF e SSF, um teste de crescimento utilizando meio sintético (glucose 50 g.L^{-1}) foi realizado em diferentes temperaturas (30, 35, 40 e 45°C) por 11 h. Este ensaio foi realizado com a estirpe PYCC 4072 de *S. cerevisiae* (1 g.L^{-1} de células). Os resultados

mostraram que a temperatura de 35°C foi a melhor para realizar os experimentos de fermentação, já que esta apresentou um crescimento mais rápido que nas demais temperaturas (D.O.₆₄₀), bem como uma taxa de crescimento maior (0,49 h⁻¹).

4.4.3. Hidrólise e fermentação em separado (SHF)

As fermentações utilizando os hidrolisados enzimáticos foram realizadas a 35°C com a estirpe PYCC 4072 de *S. cerevisiae* (1 g.L⁻¹ de células) em incubadora de agitação orbital a 150 rpm por 24 h, com alíquotas sendo retiradas a cada 3 h. A **FIGURA 27** mostra o consumo de glucose e a produção de etanol obtidos nos experimentos de SHF para o hidrolisado enzimático do bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor.

Os perfis de consumo de glucose foram semelhantes entre os experimentos realizados com os hidrolisados dos substratos BEV-IA, sendo que, em 10 h de reação, praticamente toda a glucose tinha sido consumida para a produção de etanol.

O rendimento em etanol para os experimentos B08 e B16 foram de 0,45 (21,73 g.L⁻¹) e 0,46 (25,02 g.L⁻¹) g de etanol.g⁻¹ de glucose, respectivamente, e as produtividades volumétricas máximas foram de 2,25 e 2,55 g.L⁻¹.h⁻¹ para os experimentos B08 e B16. Estes resultados foram muito semelhantes ao controle (glucose 50 g.L⁻¹), que apresentou rendimento em etanol de 0,45 g de etanol.g⁻¹ de glucose (22,53 g.L⁻¹).

No ponto central do planejamento, pode-se observar uma média de 0,52±0,01 g de etanol.g⁻¹ de glucose (23,5±0,96 g.L⁻¹), o que implica em um desvio padrão relativo de apenas 1,1% para resultados obtidos em triplicata (B05, B06 e B07). Estes resultados demonstraram que os procedimentos empregados neste trabalho apresentaram uma boa reprodutibilidade.

Santos *et al.* (2010) obtiveram resultados inferiores aos apresentados no presente trabalho para SHF de bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor (200°C, 7 min e 50% de umidade), tanto para substratos lignificados (ou seja, apenas lavados com água para remoção de compostos solúveis após o pré-tratamento) quanto para substratos deslignificados com NaOH 1% a 100°C por 1 h. A fermentação foi realizada utilizando a levedura *S. cerevisiae* (UFPEDA 1238) após hidrólise enzimática dos substratos com preparações comerciais de celulasas e β-glucosidases (Novozymes) contendo 30 FPU.g⁻¹ e 20 CBU.g⁻¹ de bagaço base seca. Os rendimentos em etanol, obtidos em ambos os casos, foram de 0,30 e 0,35 g de etanol.g⁻¹ de glucose para os hidrolisados dos bagaços lignificado e deslignificado, respectivamente. Já a produtividade volumétrica máxima foi de 0,25 g.L⁻¹.h⁻¹ para o material deslignificado e de 0,19 g.L⁻¹.h⁻¹ para o não deslignificado.

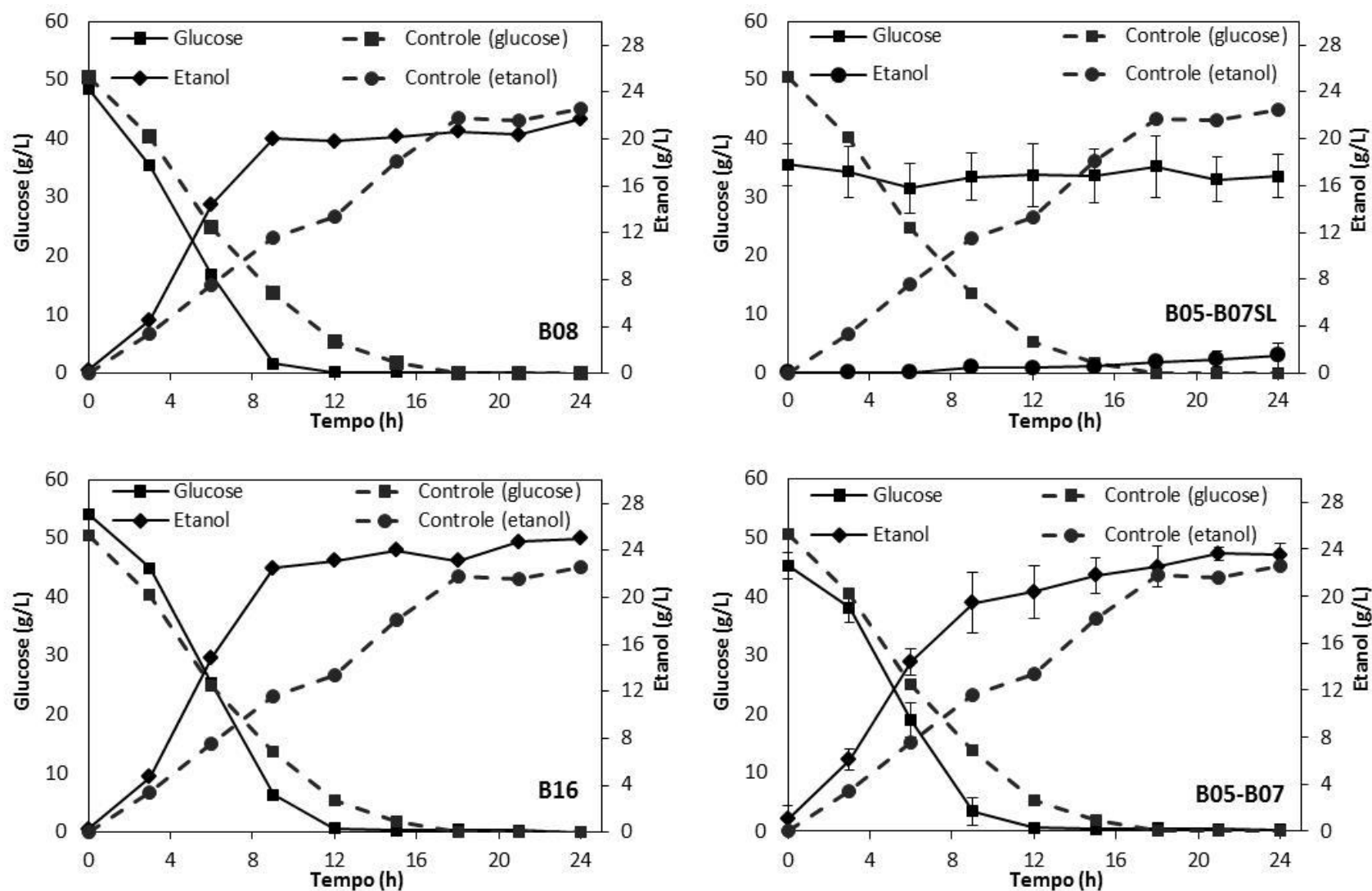


FIGURA 27. CONSUMO DE GLUCOSE E PRODUÇÃO DE ETANOL OBTIDO NO EXPERIMENTO DE SHF PARA OS HIDRÓLISADOS ENZIMÁTICOS DO BAGAÇO DE CANA PRÉ-TRATADO A VAPOR.

Wanderley *et al.* (2013) também estudaram a produção de etanol a partir do bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor (200°C, 7 min), deslignificado ou não com NaOH 1% a 100°C por 1 h. A hidrólise enzimática dos substratos foi realizada com as enzimas comerciais Celuclast 1.5L (10 FPU.g⁻¹ de celulose) e Novozym 188 (5% e 10%, v.v⁻¹), com e sem batelada alimentada por 120 h a 150 rpm, 50°C e 8% de substrato inicial, sendo que, no experimento de batelada alimentada, a adição de 1 g de substrato ocorreu após 12 h de reação. A produção de açúcar para os experimentos realizados sem batelada alimentada foi de 17 g.L⁻¹ e 39 g.L⁻¹ para os substratos com e sem lignina, respectivamente. Já para os ensaios realizados com a adição de substrato (batelada alimentada), a produção de açúcar foi de 23 g.L⁻¹ para o bagaço lignificado e de 53 g.L⁻¹ para o bagaço deslignificado. No presente trabalho, a concentração de glucose após 96 h de reação variou de 45 a 55 g.L⁻¹, valores muito próximos aos obtidos por Wanderley *et al.* (2013) para o substrato deslignificado, indicando que a presença de lignina não limitou em grande extensão o acesso das enzimas aos substratos. O melhor resultado de fermentação obtido para o substrato deslignificado e hidrolisado em batelada alimentada (UFPEDA 1238 *S. cerevisiae* 4 g.L⁻¹, 34°C, 24 h) foi de 23,38±0,43 g.L⁻¹ de etanol. Este resultado foi muito próximo ao obtido para o experimento B16, que proporcionou uma produção de etanol de 23,50±0,96 g.L⁻¹ empregando a levedura PYCC 4072 *S. cerevisiae* (1 g.L⁻¹) a 35°C por 24 h, confirmando assim que a remoção da lignina não é necessária para se obter altos rendimentos em etanol.

Os resultados obtidos para os hidrolisados enzimáticos BEV-SL (B05SL, B06SL e B07SL) foram muito inferiores aos BEV-IA (B05, B06 e B07). Para estes experimentos, a produção média de etanol foi de 0,24±0,07 g de etanol.g⁻¹ de glucose e a produtividade volumétrica máxima foi de 0,1±0,0 g.L⁻¹.h⁻¹, indicando que os compostos solúveis produzidos durante o processo de pré-tratamento também inibem a produção de etanol pelas leveduras. O consumo médio de glucose foi de 2,85±0,55 g.L⁻¹ e este consumo produziu apenas 0,9±0,25 g.L⁻¹ de etanol.

Como dito anteriormente, muitos trabalhos relatam que a formação de furfural e HMF, durante o processo de pré-tratamento, inibe o crescimento dos microrganismos fermentativos, principalmente em processo que utilizam ácido mineral diluído (LIU *et al.*, 2004). Estudos realizados por Delgenes *et al.* (1996) mostraram que a presença de furfural e HMF inibiram a produção de etanol a partir glucose utilizando *S. cerevisiae*, mesmo quando presentes em concentrações muito baixas (0,5 g.L⁻¹). Já para os produtos de degradação da lignina, a vanilina apresentou inibição moderada, enquanto que o siringaldeído, o ácido 3-hidroxibenzóico e o ácido siríngico não afetaram a fermentação em concentrações de até 0,1 % (m/m) (ANDO *et al.*, 1988).

Em estudos de fermentação por *SHF* de amostras de palha de milho pré-tratada a vapor (190°C, 5 min, 3% SO₂), Ohgren *et al.* (2007) obtiveram 19,4 e 16,8 g.L⁻¹ de etanol após 120 h de fermentação dos hidrolisados derivados de substratos lavados e não lavados, respectivamente. O resultado obtido para o substrato não lavado foi superior ao encontrado em nossos estudos. Entretanto, estes autores não descrevem a presença de compostos fenólicos na fração solúvel obtida após ao pré-tratamento da palha, mas apenas a presença de glucose (6,6 g.L⁻¹), xilose (24,8 g.L⁻¹), ácido acético (2,6 g.L⁻¹), furfural (0,7 g.L⁻¹) e HMF (0,6 g.L⁻¹). A concentração de furfural e HMF descrito Ohgren e colaboradores (2007) foi muito inferior aos obtidos neste trabalho (**TABELA 18**), indicando que os compostos formados por desidratação de carboidratos durante o processo de pré-tratamento são as principais fontes de inibição das enzimas e dos microrganismos de fermentação.

4.4.4. Fermentação e sacarificação simultâneas (SSF)

Os experimentos de *SSF* foram realizados sem um período de pré-sacarificação, isto é, as enzimas e as leveduras foram adicionadas ao substrato simultaneamente. Estes ensaios foram realizados a 35°C com 12% de substrato (m.v⁻¹), 62,5 mg de Cellic CTec 2. g⁻¹ de substrato e 1 g.L⁻¹ de células em incubadora de agitação orbital a 150 rpm por 96 h. Todos os substratos (B08, B16 e B05 a B07) foram fermentados com a estirpe PYCC 4072 de *S. cerevisiae* e os pontos centrais do planejamento também foram fermentados com a estirpe Thermossac® Dry de *S. cerevisiae*.

A **FIGURA 28** mostra a concentração de glucose e a produção de etanol para os experimentos de *SSF* utilizando a levedura PYCC 4072 de *S. cerevisiae*. Os experimentos B08 e B16 produziram 17,73 e 21,68 g.L⁻¹ de etanol, respectivamente. Já para os experimentos do ponto central do planejamento, a produção média foi de 17,62±0,96 g.L⁻¹ para os substratos BEV-IA e de 1,35±0,14 g.L⁻¹ para os substratos BEV-SL.

Os resultados de *SSF* para os substratos BEV-IA apresentaram produção de etanol inferior aos experimentos realizados por *SHF*, fato este atribuído à temperatura utilizada nos experimentos de *SSF*. Tal condição prejudicou a sacarificação da celulose, porque a ação ótima das celulasas ocorre em torno de 50 °C.

A concentração de glucose em todos os substratos BEV-IA manteve-se muito baixa porque, como dito acima, não houve a etapa de pré-sacarificação. Os níveis máximos de glucose foram de aproximadamente 2 g.L⁻¹ nas primeiras horas de reação e estes foram rapidamente consumidos pelas leveduras, levando a valores inferiores a 1 g.L⁻¹ que permaneceram constantes até o final do processo (**FIGURA 28**).

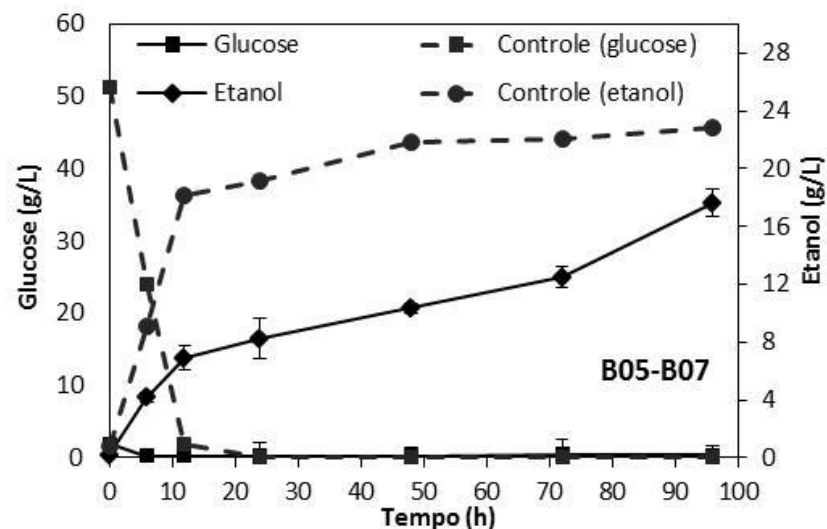
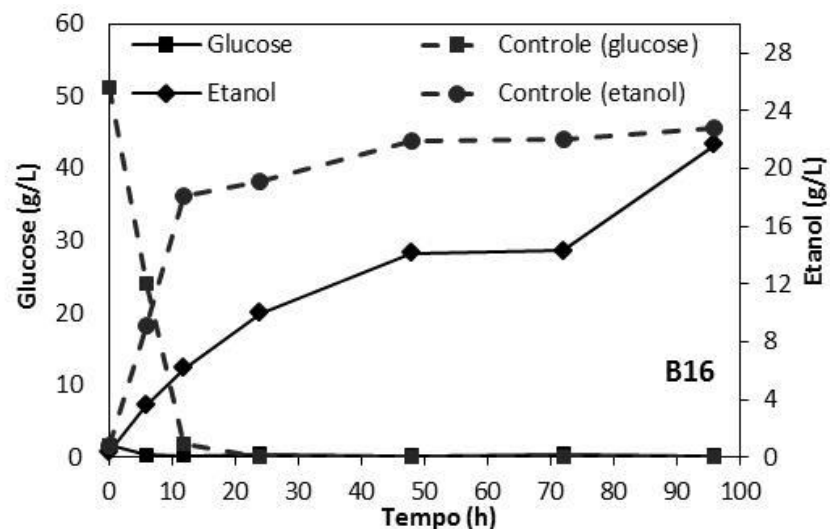
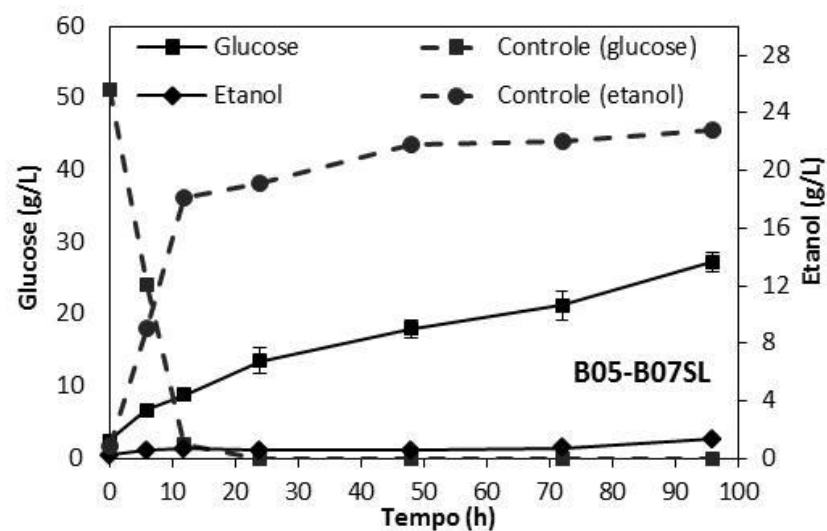
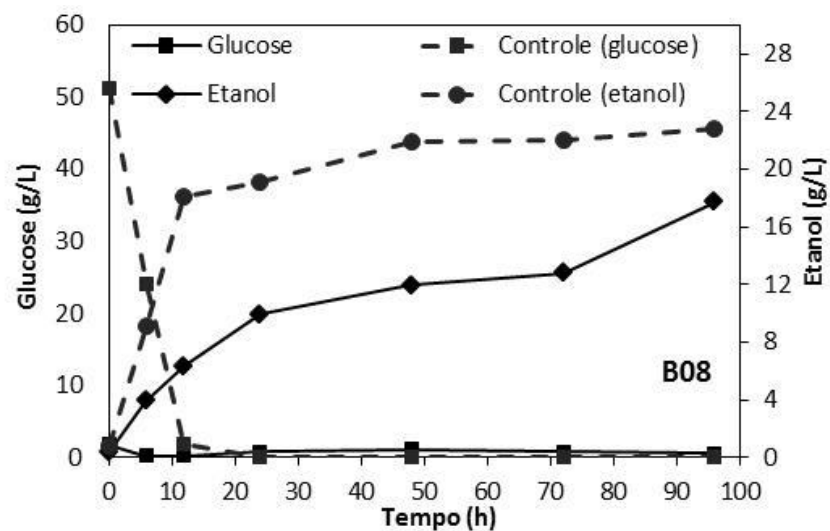


FIGURA 28. CONCENTRAÇÃO DE GLUCOSE E PRODUÇÃO DE ETANOL OBTIDOS NOS EXPERIMENTOS DE SSF PARA LEVEDURA PYCC4072 DE *S. cerevisiae*.

De maneira análoga aos resultados obtidos nos ensaios de *SHF* (item 4.4.3), os experimentos de *SSF* obtidos para os substratos BEV-SL foram muito inferiores aos experimentos realizados com os substratos BEV-IA, confirmando que os compostos solúveis produzidos durante o processo de pré-tratamento inibiram o crescimento das leveduras, já que as enzimas hidrolizaram grande parte da celulose disponível nos substratos, como pode ser observado na **FIGURA 28**. O ensaio realizado como controle (glucose 50 g.L⁻¹) apresentou produção de 22,82 g.L⁻¹ valor semelhante ao obtido para o experimento B16 (21,68 g.L⁻¹), sendo que em 24 h todo o açúcar tinha sido convertido a etanol (**FIGURA 28**).

Os experimentos de *SSF* também foram realizados com a levedura Thermossac[®] Dry de *S. cerevisiae* para os pontos centrais do planejamento. A **TABELA 24** mostra os resultados obtidos nos experimentos *SSF* para ambas as leveduras, PYCC 4072 e Thermossac[®] Dry.

TABELA 24. CONCENTRAÇÃO DE GLUCOSE E PRODUÇÃO DE ETANOL OBTIDO NOS EXPERIMENTOS DE *SSF* PARA PYCC 4072 E THERMOSSAC[®] DRY DE *S. cerevisiae*.

Tempo (h)	Glucose		Etanol	
	BEV-IA	BEV-SL	BEV-IA	BEV-SL
<i>PYCC 4072 (g.L⁻¹)</i>				
0	1,90±0,29	2,54±0,39	0,19±0,03	0,23±0,03
12	0,30±0,03	8,90±0,13	6,90±0,86	0,69±0,17
24	0,26±0,05	13,59±1,78	8,23±1,40	0,59±0,19
48	0,28±0,12	18,07±1,20	10,36±0,34	0,60±0,15
72	0,42±0,13	21,24±2,12	12,48±0,75	0,74±0,20
96	0,45±0,03	27,31±1,35	17,62±0,96	1,35±0,14
<i>Thermossac[®] Dry (g.L⁻¹)</i>				
0	2,01±0,30	3,59±0,84	0,20±0,06	0,17±0,06
12	0,29±0,02	7,99±0,48	6,41±1,32	1,67±0,05
24	0,26±0,09	11,24±1,11	7,81±0,36	1,64±0,22
48	0,21±0,06	17,29±1,21	9,82±2,30	1,58±0,08
72	0,71±0,20	21,07±2,07	10,78±1,38	1,77±0,43
96	0,57±0,11	26,42±1,94	15,35±0,55	2,30±0,29

A produção de glucose para os substratos BEV-IA e BEV-SL foi semelhante para as duas leveduras. A produção de etanol para os experimentos realizados com os substratos BEV-IA também foi semelhante para ambas. Já para os substratos BEV-SL, a

maior produção de etanol foi observada para a levedura Thermossac® Dry, indicando que esta é menos inibida pelos compostos solúveis do que a PYCC 4072.

A **TABELA 25** mostra o rendimento em etanol obtido por *SSF* com a utilização de diferentes concentrações de substrato e diferentes linhagens de *S. cerevisiae*. Todos os experimentos foram realizados com celulasas e β -glucosidases comerciais. O rendimento em etanol ($Y_{E/C}$) foi expresso em relação à concentração de substrato empregado nos experimentos de *SSF* para facilitar a comparação dos resultados entre os trabalhos. Neste sentido, os resultados disponíveis na literatura e descritos na **TABELA 25** foram comparados ao experimento B16 (195°C, 7,5 min) realizado neste trabalho, já que este proporcionou maior rendimento em etanol.

O rendimento em etanol ($Y_{E/C}$) para os ensaios realizados por Santos *et al.* (2012), Rudolf *et al.* (2008) e Hari *et al.* (2001) foram superiores ao obtido no presente trabalho. Esta diferença pode ser atribuída ao tipo de pré-tratamento, à concentração do inóculo, à carga enzimática e à temperatura utilizada nos experimentos de *SSF*.

TABELA 25. RENDIMENTO EM ETANOL OBTIDO POR *SSF* UTILIZANDO DE BAGAÇO DE CANA E DIFERENTES LINHAGENS DE *S. cerevisiae*.

Substrato (g.L ⁻¹)	Levedura	Condições	FPU por g de celulose	Etanol (g.L ⁻¹)	$Y_{E/B}$ ¹	Referência
120	PYCC 4072	35°C, 96 h	24	21,68	0,18	Este trabalho
80	UFPEDA 1238	32°C, 72 h	30	12,0	0,15	Santos <i>et al.</i> , 2010
80	UFPEDA 1238	37°C, 72 h	20	27,7	0,34	Santos <i>et al.</i> , 2012
50	TMB3400	37°C, 90 h	12	18,2	0,36	Rudolf <i>et al.</i> , 2008
75	TMB3400	37°C, 90 h	12	26,0	0,35	Rudolf <i>et al.</i> , 2008
100	NRRLY132	43°C, 72 h	40	25,0	0,25	Hari <i>et al.</i> , 2001
80	LBM-1	37°C, 80 h	15	13,8	0,17	Costa, 2011

¹ g de etanol/g de biomassa

Santos e colaboradores (2012) utilizaram substratos deslignificado (NaOH 1%, 100°C por 1 h) de bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor (200°C, 7,0 min) em concentração de substrato de 8% (m.v⁻¹) para a produção de etanol (processo *SSF*), o que equivale a um percentual nas fibras de 82% de celulose, 6,4% de hemiceluloses e

apenas 3,0% de lignina. Já o presente trabalho usou a mesma matéria-prima e o mesmo processo de pré-tratamento, mas o substrato não foi submetido à etapa de deslignificação, apresentando uma composição química de 47,44% de celulose e 26% de lignina para o experimento B16 (195°C, 7,5 min). Tais diferenças na composição química do substrato podem ter levado à maior produção de etanol nos estudos realizados por Santos *et al.* (2012), já que a concentração de celulose, em relação à quantidade de sólidos totais empregada no ensaio, foi de aproximadamente 66 g.L⁻¹ contra 57 g.L⁻¹ utilizado no presente trabalho. Além disso, o experimento de *SSF* foi realizado com uma etapa adicional de pré-hidrólise de 12 h, permitindo que as enzimas atuassem nas primeiras horas de reação na sua condição ótima (50°C) e as leveduras fossem adicionadas ao meio contendo açúcares para serem consumidos de imediato, o que não ocorre no processo de *SSF* sem a etapa de pré-hidrólise, onde as enzimas e as leveduras são adicionadas ao mesmo tempo ao meio reacional, aumentando assim o tempo de adaptação dos microrganismos no meio reacional (fase lag) (ROCHA, 2010).

No caso do trabalho realizado por Rudolf *et al.* (2008), os experimentos de *SSF* foram realizados utilizando bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor (195°C, 5 min, 2% SO₂ m.m⁻¹) em concentrações de substrato que variaram de 5 a 7,5% (m.v⁻¹) e uma concentração de inóculo 4 vezes maior que a utilizada no presente trabalho (1 g.L⁻¹). Este fato pode ter aumentado a produção de etanol, já que a concentração de inóculo influencia diretamente na taxa de conversão da glucose em etanol (LIMA *et al.*, 2001). Já as principais diferenças observadas em relação ao ensaio realizado por Hari e colaboradores (2001) foram a concentração de inóculo (10% v.v⁻¹), a temperatura (43°C) e processo de pré-tratamento do bagaço (NaOH/H₂O₂). Segundo estes autores, o processo de pré-tratamento utilizado, além de remover a lignina do substrato, diminui a cristalinidade e aumenta a sua área superficial. Entretanto, estes autores não descreveram a composição química do bagaço antes e após o pré-tratamento, impossibilitando a realização de um estudo comparativo. Além disso, Hari *et al.* (2001) utilizaram uma levedura termotolerante, que permitiu que o experimento de *SSF* fosse realizado em uma temperatura muito próxima da ótima das enzimas (50°C), aumentando assim a eficiência do processo.

Os valores apresentados nos ensaios realizados por Santos *et al.* (2010) e Costa (2011) foram inferiores aos obtidos no presente trabalho. Santos *et al.* (2010) obtiveram rendimentos de 0,15 g de etanol.g⁻¹ de substrato (12 g.L⁻¹ de etanol) em 72 h de reação utilizando amostras de bagaço de cana pré-tratadas por explosão a vapor (200 °C por 7 min) e deslignificadas em meio alcalino (NaOH 1%, 100°C por 1 h), utilizando 1 g.L⁻¹ de levedura (*S. cerevisiae* UFPEDA 1238) a 30°C. Nossos resultados foram superiores a estes rendimentos, mesmo utilizando o bagaço de cana lignificado, indicando mais uma

vez que a lignina presente no substrato não foi uma barreira física intransponível para a ação das enzimas. Por outro lado, o resultado obtido por Costa (2011) para o bagaço de cana pré-tratado com ácido sulfúrico diluído (H_2SO_4 5%, 121°C, 30 min, autoclave) e posteriormente deslignificado com álcali (NaOH 4%, 121°C, 30 min, autoclave) também proporcionou resultado inferior ao presente trabalho. Os ensaios de *SSF* foram realizados com uma etapa de pré-hidrólise de 76 h com as leveduras sendo adicionadas ao meio na concentração de 2 g.L⁻¹ e a fermentação sendo realizada por 12 h. Considerando que a autora pré-hidrolisou o substrato por um tempo muito longo e só depois adicionou as leveduras, esperar-se-ia um resultado superior em etanol, já que a etapa de pré-hidrólise, como dito anteriormente, produz um meio reacional rico em açúcares fermentescíveis para ação das leveduras. Além disso, a autora não descreve a composição química do bagaço após o pré-tratamento.

4.4.5. Crescimento celular na presença de inibidores

As leveduras usadas neste trabalho são comumente utilizadas na fermentação viníca e apresentam alta tolerância a compostos fenólicos e ao seu principal produto, o etanol. Entretanto, os resultados apresentados neste trabalho mostraram que ambas foram fortemente inibidas por compostos solúveis gerados no processo de pré-tratamento, sempre que estes não foram anteriormente removidos por lavagem aquosa. Com intuito de avaliar o efeito dos compostos solúveis no crescimento destas leveduras, foi realizado um teste de crescimento utilizando meio sintético (50 g.L⁻¹ de glucose), ao qual foi adicionado furfural em diferentes concentrações (8, 4 e 2 g.L⁻¹) ou a fração solúvel (liofilizada ou não) obtida após o pré-tratamento de um dos pontos centrais do planejamento (B05). Os testes foram realizados utilizando 1 g.L⁻¹ de células e suplementada com 6,7 g.L⁻¹ de YNB (Difco Yeast Nitrogen Base) a 35°C, 150 rpm por 24 h de reação. A **FIGURA 29** mostra os resultados obtidos para os experimentos realizados ambas as leveduras, PYCC 4072 e Thermossac[®] Dry.

O crescimento obtido para os experimentos realizados com 8 g.L⁻¹ foi de 1,49±0,07 e 1,08±0,04 para PYCC 4072 e Thermossac[®] Dry, respectivamente (**FIGURA 29A**). Estes resultados demonstram que ambas as leveduras são inibidas pelo furfural nesta concentração e explicam os resultados obtidos nos experimentos de *SHF* e *SSF* realizados com o substrato BEV-SL, já que a concentração deste componente na fração solúvel do pré-tratamento para o ponto central do planejamento foi de aproximadamente 10 g.L⁻¹ (vide **TABELA 15**).

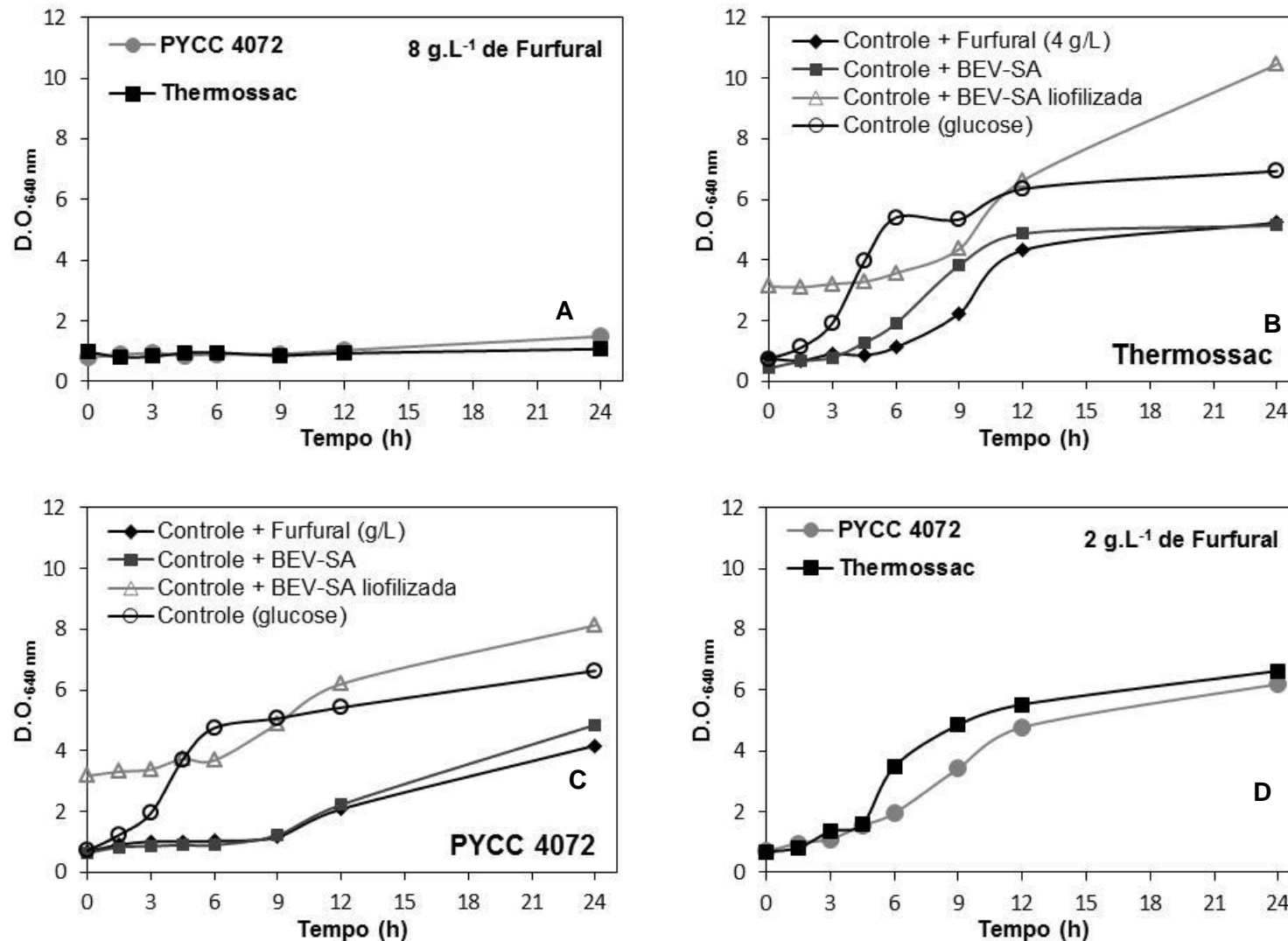


FIGURA 29. TAXA DE CRESCIMENTO PARA AS LEVEDURAS PYCC 4072 E THERMOSSAC DRY® DE *S. cerevisiae*. (A) 8 g.L⁻¹ DE FURFURAL; (B) e (C) 4 g.L⁻¹ DE FURFURAL (D) 2 g.L⁻¹ DE FURFURAL.

A produção de biomassa para os experimentos controle foi de $6,64 \pm 0,57$ para a PYCC 4072, enquanto que, para Thermossac® Dry, foi de $6,94 \pm 0,01$, indicando comportamentos semelhantes entre as duas leveduras (**FIGURAS 29B e 29C**). Resultados semelhantes foram observados para os experimentos realizados com 2 g.L^{-1} de furfural (**FIGURA 29D**), onde a produção de biomassa final foi de $6,20 \pm 0,28$ e $6,64 \pm 0,06$ para a PYCC 4072 e para a Thermossac® Dry, respectivamente, indicando que, nesta concentração, o furfural não inibe o crescimento das leveduras.

Os experimentos realizados com 4 g.L^{-1} de furfural e com a fração BEV-SA (não liofilizada), derivada do pré-tratamento no ponto central do planejamento, apresentaram produção de biomassa de $4,18 \pm 0,08$ e $4,86 \pm 0,48$ para a levedura PYCC 4072, respectivamente (**FIGURA 29C**). Já a produção de biomassa para a levedura Thermossac® Dry foi de $5,24 \pm 0,65$ no experimento realizado com furfural e de $5,15 \pm 0,76$ no experimento utilizando a fração BEV-SA do pré-tratamento. Os resultados obtidos para esses experimentos indicaram que tanto o furfural quanto os compostos aromáticos presente na fração BEV-SA (compostos fenólicos, furfural e HMF) não inibiram em grande extensão a produção de biomassa, já que os resultados foram próximo ao controle.

O crescimento das leveduras também foi avaliado utilizando a fração BEV-SA após liofilização (**FIGURAS 29B e 29C**), pois em ensaios anteriores para determinação da temperatura ótima da levedura, observou-se que ao adicionar esta fração liofilizada, o crescimento da biomassa aumentou, bem como a produção de etanol, indicando que os compostos solúveis oriundos do pré-tratamento não afetariam na etapa de fermentação. Entretanto, quando os substratos BEV-SL foram submetidos aos processos de SHF e SSF, os resultados mostraram que tanto as enzimas como as leveduras foram inibidas por estes compostos.

Os perfis de crescimento apresentados para os ensaios com a fração BEV-SA liofilizada confirmaram os resultados obtidos anteriormente, apresentando produção de biomassa de $8,14 \pm 0,12$ e $10,46 \pm 0,18$ para a PYCC 4072 e para Thermossac® Dry, respectivamente, portanto, valores superiores ao controle e aos demais ensaios (**FIGURAS 29B E 29C**). Nesta etapa, uma nova análise por CLAE foi realizada na fração BEV-SA para avaliar a diferença na composição química antes e após a liofilização e foi constatado que a concentração de furfural e de HMF na fração BEV-SA liofilizada era inferior a $0,5 \text{ g.L}^{-1}$, indicando que o processo de liofilização foi capaz de remover quase que totalmente este. Entretanto, a maior produção de biomassa também pode ser atribuída ao aumento da fonte de carbono neste experimento em relação aos demais (anidroglicose).

Os resultados obtidos para o teste de inibição frente a diferentes concentrações de furfural indicaram que este composto é o principal responsável pela inibição das leveduras durante a etapa de fermentação, o que pode inviabilizar a produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos quando o material não é submetido a uma etapa de lavagem para a sua remoção.

A **TABELA 26** mostra alguns resultados experimentais sobre a inibição de furanos (HMF e F) em processos de fermentação (ALMEIDA *et al.*, 2009). A maior concentração de furfural utilizada nestes experimentos foi de 12 g.L^{-1} em estudos realizados por Delgenes *et al.* (1996) e os resultados mostram inibições de 89% para produção de etanol e 90% para a produção de biomassa. Para os experimentos de SHF e SSF realizados no presente trabalho com a levedura PYCC 4072, a produção de etanol foi reduzida em 96% e 92%, respectivamente, considerando a produção de etanol máxima obtida para os substratos lavados com água. Já para a levedura Thermossac[®] Dry, a produção em etanol pelo processo SSF diminuiu 85%, indicando mais uma vez que esta levedura é mais tolerante a maiores concentrações de furfural do que a PYCC 4072.

O HMF também apresenta efeito negativo sobre as leveduras, embora a toxicidade deste composto sobre os microrganismos é menor que a do furfural, como mostra os experimentos de inibição apresentados na **TABELA 26**. A concentração de HMF observado na fração BEV-SA, obtida após ao pré-tratamento por explosão a vapor do bagaço de cana para o ponto central do planejamento, foi de $0,73 \pm 0,04 \text{ g.L}^{-1}$ (vide experimento B05-B07, **TABELA 15**), inferior aos descritos como inibitórios para as leveduras (**TABELA 26**). Tais resultados mostram que este composto inibe o crescimento da levedura e a produção de etanol em concentrações acima de $1,0 \text{ g.L}^{-1}$. Taherzadeh e colaboradores (2000) descrevem inibições de 41% para a produção de biomassa e 71% para a produção de etanol quando o experimento foi realizado usando uma concentração de HMF de 4 g.L^{-1} em 12 h de reação e 1 g.L^{-1} de células.

O efeito tóxico ocasionado por furfural e HMF está associado ao fato destes aldeídos serem quimicamente ativos, podendo reagir com determinadas moléculas biológicas tais como lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos causando danos à membrana celular. Por outro lado, quando estes compostos estão em concentrações inferiores aos inibitórios, a levedura *S. cerevisiae* é capaz de convertê-los em produtos menos tóxicos, sendo que em condições anaeróbicas, o HMF e o furfural são convertidos, principalmente, aos seus álcoois correspondentes, furano dimetanol e álcool furfurílico, respectivamente (ASK *et al.*, 2013). Neste sentido, para aumentar a fermentabilidade dos hidrolisados obtidos a partir de substratos pré-tratados, é necessário reduzir a concentração ou eliminar totalmente do meio reacional os furanos oriundos do pré-tratamento ou ainda desenvolver microrganismos mais tolerantes a esse tipo de compostos.

TABELA 26. DADOS EXPERIMENTAIS SOBRE A INIBIÇÃO DE FURANOS EM PROCESSOS FERMENTATIVOS UTILIZANDO *S. cerevisiae* (TABELA ADAPTADA DE ALMEIDA *et al.*, 2009).

Inibidor (g.L ⁻¹)	Etanol (%) ¹	Biomassa (%) ²	Tempo (h)	Inóculo	Referência
<i>Furfural</i>					
0,5-4,0	21-97	0-80	48	0,7% (v.v ⁻¹)	Banerjee <i>et al.</i> , 1981
1,0-2,0	40	7-13 ³	30	0,1 (g.L ⁻¹)	Boyer <i>et al.</i> , 1992
1,0-2,0	4-12 ³	6-19	30	2,0 (g.L ⁻¹)	Boyer <i>et al.</i> , 1992
0,9-5,1	18-87	23-100	5-10	D.O. 1,5	Palmqvist <i>et al.</i> , 1999
1,0-5,0	4-100 ⁴	51-91 ⁵	-	0,55 (g.L ⁻¹)	Navarro, 1994
1,0-5,0	1-44 ⁴	4-39 ⁵	-	2,5 (g.L ⁻¹)	Navarro, 1994
4,0	56	89	12	1,0 (g.L ⁻¹)	Taherzadeh <i>et al.</i> , 2000
0,5-12	43-89	47-90	24	3% (v.v ⁻¹)	Delgenes <i>et al.</i> , 1996
<i>Hidroximetilfurfural (HMF)</i>					
2,0-4,0	19-41	40-71	12	1,0 (g.L ⁻¹)	Taherzadeh <i>et al.</i> , 2000
1,0-2,0	0-6 ⁴	-	144	5% (v.v ⁻¹)	Sanchez e Bautista, 1988
1,0-5,0	71-95	65-89	24	3% (v.v ⁻¹)	Delgenes <i>et al.</i> , 1996
1,5	-	39	2	0,8 (g.L ⁻¹)	Petersson <i>et al.</i> , 2006

¹ Redução na produção de etanol,

² Redução na produção de biomassa.

³ Estimado a partir de uma figura.

⁴ Calculado em relação a produtividade volumétrica máxima de etanol.

⁵ Calculado em relação a taxa de crescimento específica máxima.

4.5. MODIFICAÇÕES QUÍMICAS DO BAGAÇO DE CANA APÓS AO PRÉ-TRATAMENTO POR EXPLOSÃO A VAPOR

As modificações químicas que ocorrem no bagaço de cana após ao pré-tratamento por explosão a vapor foram avaliadas em relação ao bagaço *in natura*. Para tal comparação, foram utilizados duas condições de pré-tratamento que não fazem parte do planejamento fatorial apresentando anteriormente (item 4.2.), mas escolhidas a partir da modelagem matemática realizada para o percentual de recuperação de anidroglicose e para a produção de furfural em relação às variáveis empregadas no pré-tratamento (vide item 4.2.2.1. e 4.2.2.2.). O modelo proposto indicou que os maiores índices de recuperação de anidroglicose e menores índices de formação de furfural são obtidos quando os experimentos são realizados em menores temperaturas (180°C), tempos de reação (5 min) e concentração de ácido (9,5 mg.g⁻¹ de bagaço). Neste sentido, as

condições selecionadas para caracterização corresponderam aos experimentos denominados B18 e B19, que foram realizados a 180°C por 5 e 10 min com 9,5 mg $\text{H}_3\text{PO}_4 \cdot \text{g}^{-1}$ de bagaço (massa seca), respectivamente.

A partir dos substratos selecionados (B18 e B19), uma série de análises foi realizada a fim de investigar os efeitos do pré-tratamento sobre a estrutura e composição química da parede celular. Os substratos selecionados foram caracterizados segundo as mesmas análises realizadas com o bagaço *in natura*.

Os rendimentos totais de recuperação após o pré-tratamento do bagaço foram de 95,4 e 98,2%, sendo 74,5 e 79,9% na fração BEV-IA e 20,9 e 19,2% na fração BEV-SA para os experimentos B18 e B19, respectivamente. Estes resultados foram semelhantes aos obtidos para o experimento de autohidrólise B16 (vide **TABELA 15**), que apresentou recuperação total de 97,3%, sendo 79,3% recuperado na fração BEV-IA e 18% na fração BEV-SA. Por outro lado, estes rendimentos foram superiores aos obtidos nos experimentos B08 (180°C, 5 min, 19 mg $\text{H}_3\text{PO}_4 \cdot \text{g}^{-1}$ de bagaço) e B09 (180°C, 10 min, 19 mg $\text{H}_3\text{PO}_4 \cdot \text{g}^{-1}$ de bagaço) (**TABELA 15**) realizados nas mesmas condições de tempo e temperatura que os experimentos B18 e B19, respectivamente, mas com maior concentração de catalisador ácido. Portanto, melhores rendimentos de recuperação são obtidos empregando concentrações de ácido fosfórico menores.

As composições químicas dos substratos selecionados foi realizada segundo o método descrito por Sluiter *et al.* (2008) e os resultados mostram que o pré-tratamento por explosão a vapor proporcionou um decréscimo no percentual de hemiceluloses em relação ao BIN, passando de 25,72% para 7,56 e 3,90% para os experimentos B18 e B19, respectivamente (**TABELA 27**). Por outro lado, os resultados obtidos para o experimento B18 e B19 foram muito semelhantes entre si, evidenciando apenas uma pequena diferença no percentual de hemiceluloses do experimento B18 em comparação com o experimento B19. Assim, o aumento do tempo de 5 para 10 min promoveu uma remoção maior das hemiceluloses. O percentual de anidroglicose e de lignina aumentaram em relação ao BIN e este resultado foi atribuído à solubilização das hemiceluloses durante o processo de pré-tratamento, como discutido anteriormente no item 4.2.

O balanço de massas obtido para as frações BEV-SA e BEV-IA dos experimentos B18 e B19 mostrou que 99% da anidroglicose presente no BIN foi recuperada após ao pré-tratamento, sendo 4% na fração BEV-SA e 95% na fração BEV-IA. Os índices de recuperação de anidroxilose foram de 81 e 82% para o experimento B18 e B19, que apresentaram recuperação de 56 e 69% na fração BEV-SA, respectivamente. Por outro lado, a arabinose apresentou menores percentuais de recuperação (65-75%) que a glicose e a xilose. Já os percentuais de recuperação da lignina na fração BEV-IA foram

altos (95 e 105%), indicando que, nestas condições de pré-tratamento, as reações de condensação preponderaram sobre as reações de hidrólise, como discutido anteriormente (vide item 4.2.1.).

TABELA 27. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA FRAÇÃO BEV-IA DO BAGAÇO DE CANA APÓS O PRÉ-TRATAMENTO POR EXPLOSÃO A VAPOR PARA AS CONDIÇÕES SELECIONADAS.

Exp.	Composição química da fração BEV-IA (%)					
	AnGlc	AnXyl	AnAra	Acetila	Lignina	Cinzas
BIN ¹	37,96±0,13	18,89±0,06	3,34±0,02	3,49±0,02	20,80±0,26	6,53±0,20
B18	52,19±0,47	7,29±0,08	0,27±0,01	nd	30,01±0,25	8,28±0,47
B19	54,96±0,95	3,76±0,14	0,14±0,02	nd	32,47±0,75	6,69±0,82

¹ BIN: composição química do bagaço *in natura*.

Em geral, a recuperação de anidroglicose, anidroxilose e lignina foram semelhantes quando comparados os experimentos B08 (19 mg H₃PO₄.g⁻¹ de bagaço) e B18 (9,5 mg H₃PO₄.g⁻¹ de bagaço) e os experimentos B09 (19 mg H₃PO₄.g⁻¹ de bagaço) e B18 (9,5 mg H₃PO₄.g⁻¹ de bagaço). Por outro lado, o balanço de massas total para anidroarabinose foi superior para os experimentos B18 (65%) e B19 (75%) em relação aos experimentos B18 (42%) e B19 (35%), indicando que, nestas condições, este monossacarídeo é menos suscetível a reações de desidração e formação de furfural. Neste sentido, a formação de furfural para os experimentos B18 e B19 foi de aproximadamente 4 g.L⁻¹, indicando que o aumento da concentração de ácido fosfórico de 9,5 mg para 19 mg gera uma concentração de furfural 2 vezes maior na fração BEV-SA.

Através do procedimento de holocelulose realizado no bagaço *in natura* livre de extrativos e para as frações BEV-IA dos experimentos pré-tratados (B18 e B19), foram obtidas os seguintes rendimentos de holocelulose: 79,71±1,82 para o BIN, 59 e 49% para os experimentos B18 e B19, respectivamente, ou seja, o percentual de extração da holocelulose diminuiu em 10 pontos percentuais com o aumento do tempo de pré-tratamento de 5 para 10 min. Além disso, o percentual de holocelulose para os substratos pré-tratados foi muito inferior ao obtido para o BIN. Em geral, estes resultados podem ser atribuído à hidrólise ácida dos polissacarídeos presente no bagaço de cana, principalmente hemiceluloses, durante o processo de pré-tratamento. Além disso, celooligômeros formados durante o processo de pré-tratamento, que permaneceram retidos nas fibras, podem ter sido removidos durante a extração da lignina com NaClO₂, causando uma diminuição no rendimento de holocelulose. As extrações das

hemiceluloses A e B do material pré-tratado não foram realizadas devido aos seus baixos teores nas fibras.

A determinação do grau de polimerização (GP_M) da holocelulose do BIN e dos substratos pré-tratados (B18 e B19) foi obtida por GPC de seus derivados tricarbamilados e os resultados estão disponíveis na **TABELA 28**.

TABELA 28. MODIFICAÇÕES NO BAGAÇO DE CANA APÓS AO PRÉ-TRATAMENTO POR EXPLOSÃO A VAPOR EM COMPARAÇÃO COM O BAGAÇO *IN NATURA*

Parâmetros	BIN ¹	B18	B19
<i>Grau de Polimerização e Polidispersidade</i>			
GP_M holocelulose ²	1196±50 (1,65) ³	710±14 (4,60)	699±24 (3,33)
MMA _{Lignina} ⁴	5465±734 (2,90)	4737±348 (3,10)	5341±141 (2,80)
<i>Índice de Cristalinidade (%)</i>			
ICr ⁵	60,90	83,61	84,46
ICr _{Holocelulose} ⁶	68,70	84,40	81,12

¹ BIN: *bagaço in natura*.

² Grau de polimerização da massa molar média para a holocelulose.

³ PD = polidispersidade, ($PD=GP_M/GP_N$)

⁴ MMA: massa molar aparente da lignina extraída com dioxano:HCl 2 mol.L⁻¹

⁵ Índice de cristalinidade (ICr) obtido para *bagaço in natura* e para o material pré-tratado (BEV-IA)

⁶ Índice de cristalinidade (ICr) da holocelulose obtida a partir do *bagaço in natura* e do material pré-tratado (BEV-IA)

O pré-tratamento com catálise fosfórica teve grande influência no GP_M da celulose, produzindo substratos com massas moleculares médias (MM_M) bastante inferiores em relação ao BIN. O GP_M dos substratos pré-tratados foi duas vezes menor que o obtido para o BIN, indicando que o pré-tratamento por explosão a vapor causa uma considerável oligomerização da celulose. Além disso, os resultados da polidispersidade (**TABELA 28**, vide valores de PD) mostram que o pré-tratamento levou a um aumento expressivo nesta medida, indicando que a distribuição em massas moleculares, após o pré-tratamento, é muito mais heterogênea do que aquela observada no material *in natura*.

O efeito do pré-tratamento sobre o índice de cristalinidade da celulose (**TABELA 28**) foi determinado por difração de raios X (DRX) do *bagaço in natura*, das fibras pré-tratadas e da fração holocelulósica delas derivadas (**FIGURA 30**).

Os resultados obtidos para os materiais pré-tratados (B18 e B19), em comparação com *bagaço de cana in natura* (BIN), mostraram que o índice de cristalinidade aumentou em aproximadamente 24 pontos percentuais para os experimentos B18 e B19. Tal resultado pode ser atribuído à remoção das hemiceluloses e de regiões menos organizadas da estrutura supramolecular da celulose, já que o pré-tratamento foi realizado na presença de H₃PO₄ (vide item 4.2 da **TABELA 16**). Já os índices de

cristalinidade dos materiais pré-tratados foram relativamente semelhantes entre si, indicando que o aumento do tempo de reação exerceu uma influência apenas marginal sobre este parâmetro de análise estrutural. Por outro lado, a determinação do índice de cristalinidade das frações holocelulósicas derivadas dos materiais pré-tratados revelou que a extração da lignina com clorito de sódio manteve a estrutura cristalina assumida pelo componente celulósico após o processo de explosão a vapor.

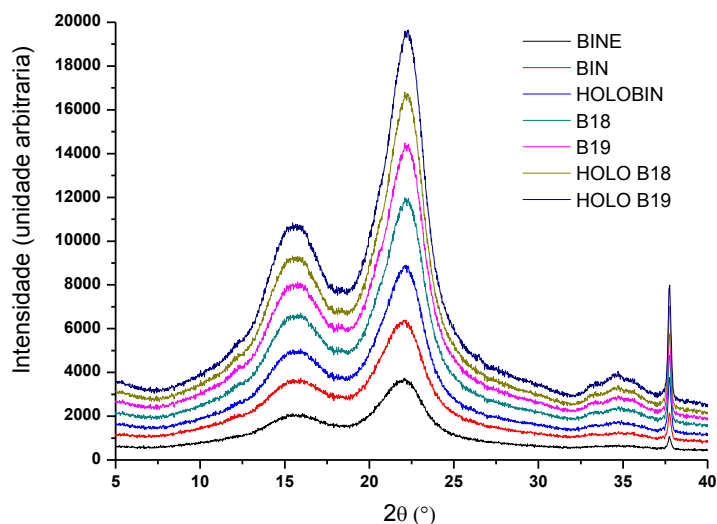


FIGURA 30. DIFRATOGRAMA DE RAO X DO BAGAÇO *IN NATURA* COM E SEM EXTRAÍVEIS, DO MATERIAL PRÉ-TRATADO POR EXPLOSÃO A VAPOR E DA HOLOCELULOSE.

A **FIGURA 30** mostra o perfil das análises por DRX do BIN e do material pré-tratado, juntamente com suas respectivas holoceluloses. O perfil destas análises revela que o pré-tratamento não foi capaz de gerar estruturas supramoleculares diferentes. Neste sentido, os difratogramas mostram um perfil característico de celulose do tipo I, com pico haloamorfo e o cristalino situados entre os ângulos $18^{\circ} \leq 2\theta \leq 19^{\circ}$ e $22^{\circ} \leq 2\theta \leq 23^{\circ}$, respectivamente (BIAN *et al.*, 2013). Além disso, a presença da lignina em algumas amostras, como no BIN e no bagaço pré-tratado, não comprometeu a realização das análises, apesar de amostras com lignina terem apresentado picos com intensidades relativamente menores do que aqueles observados em amostras deslignificadas (holocelulose).

A lignina presente na fração BEV-IA do bagaço pré-tratado (B18 e B19) também foi isolada utilizando dioxano:HCl 2 mol.L⁻¹ e a **TABELA 29** mostra o rendimento de recuperação da lignina, bem como a composição química do material residual (fibras) que permaneceu insolúvel após o procedimento de extração.

TABELA 29. RENDIMENTO DE RECUPERAÇÃO E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA LIGNINA APÓS A EXTRAÇÃO COM DIOXANO:HCl_{aq}.

Componentes	Composição química da lignina (%)		
	Bagaço	B18	B19
Anidroglucose	nd	nd	nd
Anidroxilose	0,59±0,01	0,16±0,04	nd
Anidroarabinose	0,37±0,01	nd	nd
Grupo acetil	nd	nd	nd
Lignina solúvel	2,24±0,10	2,00±0,15	2,54±0,01
Lignina insolúvel	89,12±1,14	84,73±0,87	85,29±1,01
TOTAL	92,32	87,11	87,83
Rendimento de extração	82,95±0,35	77,42±0,39	76,47±0,28

O rendimento de extração foi de 82,95±0,35% da lignina presente no BIN, valor este calculado em relação ao teor de lignina de Klason presente no material de origem. Para os experimentos B18 e B19, os rendimentos foram 77,42 e 76,47% da lignina presente na fração BEV-IA, respectivamente. Estes resultados podem ser atribuídos à hidrólise ou modificações na estrutura da lignina que são inerentes ao processo de pré-tratamento, provavelmente devidas à condensação de compostos fenólicos e de compostos furânicos formados durante o pré-tratamento, o que torna a lignina mais recalcitrante e menos reativa que a lignina de origem. Por outro lado, este resultado de extração foi superior ao apresentado por Nascimento (2009) para a extração da lignina do bagaço de cana pré-tratado a vapor (195°C, 10 min) com dioxano:H₂O (9:1, v.v⁻¹), que proporcionou extração de apenas 44,2% da lignina presente no bagaço.

O procedimento de extração com dioxano:HCl resultou em uma pequena contaminação de carboidratos na lignina do BIN (0,96%) e, nos materiais pré-tratados, apenas o B18 apresentou 0,16% de xilose em sua composição (**TABELA 29**). Entretanto, os percentuais de contaminação de carboidratos obtidos neste trabalho foram inferiores ao obtido para o bagaço de cana pré-tratado a vapor (195°C, 10 min) e submetido à extração com dioxano:H₂O, que apresentaram 7,47% de carboidratos contaminantes. Deste total, 1,42% corresponderam à glucose, além de 4,18% à xilose, 0,78% à arabinose e 1,09% aos grupos acetila, os quais, em conjunto, correspondem à fração de hemiceluloses que pode estar ligada quimicamente à lignina na forma de complexo lignina-carboidrato (Nascimento, 2007). Finalmente, a presença de grupos acetila não foi detectada, possivelmente por estar em uma concentração inferior ao limite de detecção do método (CLAE).

A determinação da distribuição da massa molar média aparente (MMA) das ligninas acetiladas foi determinada por GPC (**TABELA 28**, vide resultados MMA). Os resultados mostram que a lignina do bagaço de cana *in natura* (BIN) apresenta uma MMA ligeiramente superior aos valores obtidos para a lignina dos bagaços pré-tratados (amostras B18 e B19). Tais valores foram de 5465 ± 734 u.m.a. para a lignina do BIN e de 4737 ± 348 e 5341 ± 141 u.m.a. para as ligninas dos experimentos B18 e B19, respectivamente. Estes resultados apresentam um decréscimo da MMA de 13 e 3% para os experimentos B18 e B19, respectivamente, em relação ao BIN, indicando que o pré-tratamento não alterou significativamente a MMA da lignina do bagaço. Este comportamento não era esperado uma vez que a hidrólise e despolimerização da estrutura da lignina, liberando ácidos fenólicos no meio, deveria ter causado uma diminuição substancial de sua MMA. Uma explicação para este fenômeno seria a condensação de compostos furânicos e ácidos fenólicos na estrutura da lignina, compensando sua perda de massa molar após a despolimerização. Vale observar que tal hipótese também estaria de acordo com o aumento de MMA com o aumento do tempo de exposição no reator de 5 (B18) para 10 (B19) min. Além disso, as polidispersidades obtidas para a lignina do BIN (2,9) e para os materiais pré-tratados (3,1 e 2,8 para B18 e B19, respectivamente) também foram muito semelhantes entre si, revelando a ocorrência de distribuições com a mesma amplitude de MMA.

A **TABELA 30** apresenta o percentual de grupos funcionais presentes nas ligninas do BIN e dos substratos derivados dos experimentos B18 e B19, após a extração com uma mistura de dioxano:HCl 2 mol.L⁻¹, 9:1 (v.v⁻¹).

TABELA 30. PERCENTUAL DE GRUPOS FUNCIONAIS PRESENTES NA LIGNINA DIOXANO:HCl_{aq}.

Componentes	Grupo funcional (%)		
	BIN	B18	B19
Hidroxilas fenólicas	1,85±0,07	2,63±0,10	2,33±0,02
Hidroxilas alifáticas	4,92±0,04	5,64±0,10	5,50±0,28
Hidroxilas totais	6,67	7,27	6,83
Carbonilas	0,71±0,01	1,17±0,08	1,74±0,01
Grupos ácido	0,27±0,01	0,21±0,04	0,19±0,02
Grupos metoxilas ²	15,4	14,1	13,9

¹ Somatório de hidroxilas fenólicas e alifáticas

² Integração da região 3,50-3,90 ppm do espectro de RMN ¹H

O teor de hidroxilas fenólicas da lignina isolada no BIN foi inferior ao observado na lignina dos materiais pré-tratados. Este resultado pode ser atribuído à maior clivagem

das ligações aril éter do tipo β -O-4 de grupos terminais da estrutura da lignina, promovendo a liberação de monolignóis ou ácidos hidroxicinâmicos, tais como o ácido *p*-cumárico e o ácido ferúlico, que foram detectados na composição da fração BEV-SA após o pré-tratamento por explosão a vapor (vide **TABELA 17**). Já o aumento do teor de hidroxilas alifáticas na lignina do material pré-tratado pode ser atribuído à hidrólise ácida de ligações aril éter, principalmente a α -O-4, que leva à formação de um carbocátion intermediário e este reage rapidamente com a água, cujo ataque nucleofílico insere uma nova hidroxila alifática na estrutura. O aumento do teor de carbonilas também está relacionado à quebra das ligações da porção alifática dos ácidos hidroxicinâmicos. Esta quebra é resultado de um ataque nucleofílico de uma molécula de água na ligação dupla da cadeia alifática, resultando em estruturas α -carbonílicas que permanecem ligadas à estrutura da lignina.

O espectro de RMN de ^1H da lignina acetilada, bem como os percentuais para as atribuições dos sinais de acordo com deslocamentos químicos descritos na literatura, estão mostrados na **TABELA 31** e na **FIGURA 31**.

TABELA 31. ATRIBUIÇÕES DOS SINAIS DE RMN DE ^1H PARA LIGNINA DIOXANO ACETILADA.

Atribuições	Lignina acetilada (%)			
	δ ppm/TMS ^{1,2}	BIN	B18	B19
H em carbonos saturados não oxigenados	0,50-1,50	15,05	19,9	22,5
Acetato alifático	1,50-2,20	4,83	5,5	4,8
Acetato aromático	2,20-2,50	2,6	4,0	4,1
H de metoxila	3,50-3,90	15,4	14,1	13,9
H β em β -O-4; β -5, β -1 e estruturas β - β	3,90-4,50	10,4	7,3	7,8
H β em β -O-4; H γ em Ar-CH=CH-CH ₂ OAc	4,50-5,20	12,1	9,0	7,4
H em OAc em estruturas β -O-4, β -5 e β -1	5,20-5,75	7,5	3,6	3,5
H-Ar em Ar-COR e Ar-R	6,20-7,90	31,1	33,9	32,8

¹ Dence e Lin (1992).

² Chen e Rober (1988).

Diferenças significativas foram observadas para a intensidade dos sinais nas ligninas obtidas a partir do material pré-tratado em comparação com o BIN, principalmente nas regiões atribuídas a H em carbono saturado não oxigenado (0,00-1,50 ppm), H em grupos metoxilas (3,50-3,90 ppm) e H aromáticos tanto em α -carbonilas como na fração alquila de estruturas aromáticas (6,20-7,90 ppm). As diferenças de intensidade destes sinais na lignina pré-tratada (**FIGURA 31**) estão relacionadas à desmetoxilação e à despolimerização pela hidrólise das ligações aril éter do tipo β -O-4 na etapa de pré-tratamento.

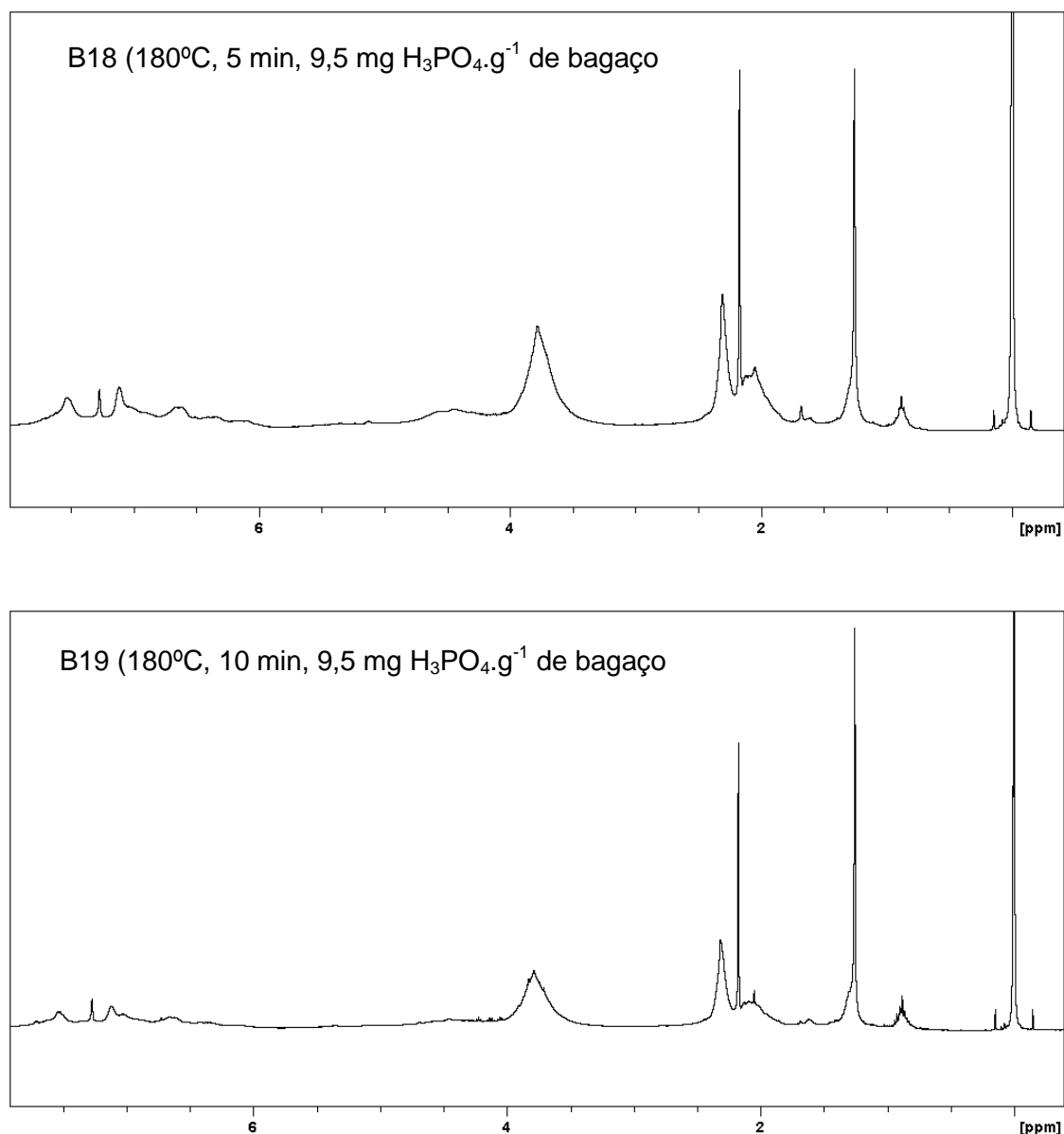


FIGURA 31. ESPECTRO DE RMN DE H¹ DA LIGNINA ACETILADA PARA OS MATERIAIS PRÉ-TRATADOS B18 E B19.

O aumento de intensidade do sinal entre 0,00 e 1,50 ppm significa que a lignina do bagaço pré-tratado apresenta um teor de hidrogênios em cadeias laterais alifáticas saturadas superior ao da lignina do BIN, devido à quebra de ligações da porção alifática da macromolécula de lignina, com discutido anteriormente. Já a diminuição dos grupos metoxílicos (3,50-3,90 ppm) pode ser atribuída à eliminação de compostos metoxilados durante o processo de pré-tratamento, gerando compostos fenólicos que foram liberados na fração BEV-SA, tais como o ácido vanílico, ácido siringico, ácido ferúlico, vanilina e siringaldeído.

O sinal em 6,20-7,90 ppm fornece uma medida direta da condensação da lignina, pois quanto menor a intensidade deste sinal, menor será a quantidade de H em estruturas aromáticas, indicando que tais posições estariam associadas a outras unidades, tanto na porção alifática, através de ligações do tipo β -5', β -2' e α -2' como na porção aromática, através de ligações do tipo 5-5', 2-O-4', 3-O-4'. Neste sentido, a intensidade deste sinal revela que, nestas condições, as reações de condensação preponderaram sobre as reações de hidrólise. Tal fato justifica os altos rendimentos de lignina nas frações BEV-IA obtidos nestas condições de pré-tratamento, principalmente para o experimento B19 (105%). Estes resultados foram ainda confirmados pelo aumento da temperatura de combustão da lignina pré-tratada em comparação com a lignina do material *in natura*, como mostram os perfis de análise termogravimétrica (ATG) apresentados na **FIGURA 32**. A temperatura média de combustão da lignina do bagaço *in natura* foi de 325°C, enquanto que, para os materiais derivados dos experimentos B18 e B19, os valores obtidos foram de 355°C e 405°C, respectivamente.

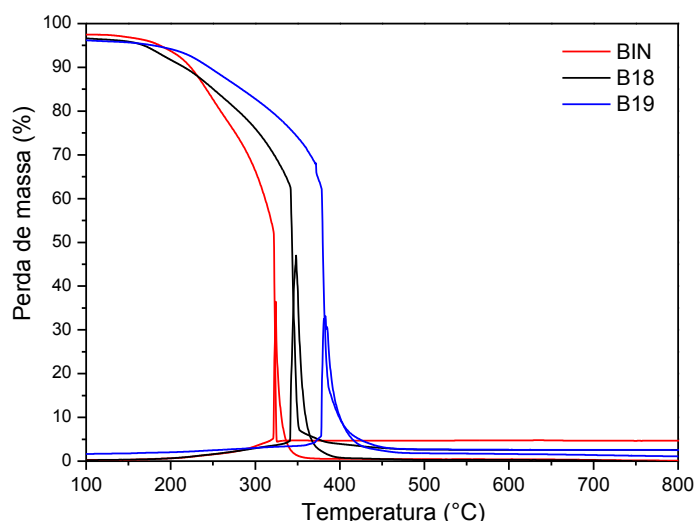


FIGURA 32. ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA DA LIGNINA EXTRAÍDA COM DIOXANO:HCl_{aq} A PARA O BAGAÇO *IN NATURA* E PARA OS MATERIAIS PRÉ-TRATADOS B18 E B19.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos para a composição química do bagaço de cana-de-açúcar foram muito semelhantes aos disponíveis na literatura. Estes resultados revelaram um alto teor de glucose e um baixo teor de lignina, fatores importantes para o bom desempenho na produção hidrolisados segunda geração e em sua posterior fermentação.

O pré-tratamento por explosão a vapor mostrou-se bastante eficiente na separação dos três principais componentes do bagaço de cana, pois, além de promover uma maior solubilização das hemiceluloses e boa recuperação de glucose após o pré-tratamento, aumentou a acessibilidade da celulose, fator importante para maximizar o rendimento na produção de etanol celulósico.

Os resultados obtidos para a caracterização química dos compostos fenólicos por eletroforese capilar (EC) mostraram que o ácido *p*-cumárico foi o componente encontrado em maior concentração para todos os experimentos. Estes resultados foram semelhantes aos obtidos por outras técnicas (CLAE e CG-EM), com a vantagem de que a EC é uma técnica simples e de baixo custo. Além disso, a concentração dos compostos fenólicos gerados durante o processo de pré-tratamento não foi considerado inibitório nas etapas de hidrólise enzimática e fermentação, de acordo com os dados descritos na literatura.

Os compostos solúveis, gerados durante o processo de pré-tratamento inibiram tanto as enzimas como as leveduras, mas o efeito maior de inibição foi observado para as leveduras. Neste sentido, os melhores resultados de *SHF* e *SSF* foram obtidos para os substratos lavados com água, sendo que os maiores rendimentos em etanol foram obtidos para os pré-tratamentos realizados a 195 °C por 7,5 (B16) e a 195°C por 7,5 min usando 9,5 mg de $\text{H}_3\text{PO}_4 \cdot \text{g}^{-1}$ de bagaço (B05-B07).

Os resultados obtidos neste trabalho mostram que altos rendimentos de hidrólise e fermentação são obtidos quando o material pré-tratado é submetido a uma etapa de lavagem para a remoção dos compostos solúveis gerados durante o processo de pré-tratamento e que o furfural é um dos principais inibidores dos microrganismos utilizados na fermentação. O teste de crescimento, realizado para as leveduras PYCC 4072 e Thermossac[®] Dry de *S. cerevisiae*, mostrou que ambas as leveduras foram inibidas pela presença de furfural. Entretanto, a PYCC 4072 é inibida em concentrações que variam de 8 a 4 g.L⁻¹, enquanto que a Thermossac[®] Dry apresentou problemas apenas na concentração de 8 mg.mL⁻¹.

As principais modificações observadas nos polissacarídeos após o pré-tratamento por explosão a vapor foram a solubilização das hemiceluloses, o aumento da cristalinidade da celulose e diminuição do grau de polimerização em comparação com o material *in natura*. O pré-tratamento por explosão a vapor também foi capaz de

despolimerizar a estrutura da lignina, gerando um decréscimo na sua massa molar aparente em relação à lignina do bagaço *in natura*. Entretanto, o aumento da drasticidade do pré-tratamento, como no caso do aumento do tempo de reação de 5 para 10 min (experimentos B18 e B19), favoreceu a ocorrência de reações de condensação durante o processo, o que resultou na produção de uma lignina mais condensada que a de origem.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADSUL, M. G.; GHULE, J. E.; SHAIKH, H.; SINGH, K. B. GOKHALE, D.V. Enzymatic hydrolysis of delignified bagasse polysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 62, 2005, p. 6-10.
- AGBOGBO, F.; WENGER, K.; Effects of pretreatment chemicals on xylose fermentation by *Pichia stipitis*. **Biotechnol Lett**, v. 28, 2006, p. 2065-2069.
- ALIZADEH, H.; TEYMOURI, F.; GILBERT, T. I.; DALE, B.E. Pretreatment of switchgrass by ammonia fiber explosion (AFEX). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 124, 2005, p. 1133-1141.
- ALMEIDA, J. R. M.; BERTILSSON, M.; GORWA-GRAUSLUND, M. F. GORSICH, S.; LIDÉN, G. Metabolic effects of furaldehydes ad impacts on biotechnological processes. **Applied Microbiol Biotechnology**, v. 82, 2009, p. 625-638.
- ALVIRA, P.; TOMÁ-PEJÁ, E.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M.J.; Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. **Bioresource Technology**, v.101, 2010, p. 4851-4861.
- ANDO, S.; ARAI, I.; KIYOTO, K.; HANAI, S. Identification of aromatic monomers in steam-exploded poplar and their influences on ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Fermentation Technology**, v. 64, 1986, p. 567-570.
- ANDO, S.; KAKIMOTO, T.; ITOH, K.; ARAI, I.; KIYOTO, K.; HANAI, S. Increased digestibility of cedar by pretreatment with peracetic acid and steam explosion. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 31, 1988, p. 802-804.
- ATTALA, R.H.; The structure of native cellulose. In: Proceedings of tricol simposion on *Trichoderma reesei* Cellulases and others hidrolases. Helsinquia: **Fundation for Biotechnical and Industruial Fermentation Research**, v. 8, 1993, p. 281-290.
- AVCI, A.; SAHA, B. C.; DIEN, B. S.; KENNEDY, G. J.; COTTA, M. A. Response surface optimization of corn stover pretreatment using dilute phosphoric acid for enzymatic hydrolysis and ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 130, 2013, p. 603-612.
- BALAT, M.; BALAT, H.; ÖZ, C. Progress in Bioethanol Processing. **Progress in Energy and Combustion Science**, v.34, 2008, p. 551-573.
- BALLESTEROS, M.; OLIVA, J. M.; NEGRO, M. J.; MANZANARES, P.; BALLESTEROS, I. Ethanol from lignocellulosic materials by a simultaneous saccharification and fermentation process (SFS) with *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. **Process Biochemistry**, v.39, 2004, p.1843-1848.

- BANERJEE, N.; BHATNAGAR, R.; VISWANATHAN, L. Inhibition of glycolysis by furfural in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 11, 1981, p. 226-228.
- BARCELOS, C. A.; BETANCUR, G. J. V.; MAEDA, R. N.; PEREIRA JR, N. The essentialness of delignification on enzymatic hydrolysis of sugar cane bagasse cellulignin for second generation ethanol production. **Waste Biomass Valor**, 2012.
- BAUDEL, H. M., Pré-tratamento e hidrólise. **III Workshop Tecnológico sobre: Hidrólise para produção de etanol**, 2006.
- BELKACEMI, K. and ALVO, P. Enzymatic saccharification of milled timothy (*Phleum pretense* L.) and alfafa (*Medicago sativa* L.). **Bioresource Technology**, v. 61, 1997, p. 185-198.
- BEZERRA, R.M.F., DIAS, A.A. Enzymatic kinetic of cellulose hydrolysis inhibition by ethanol and cellobiose. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 126, 2005, p. 49-59.
- BIAN, J.; PENG, F.; PENG, P. X.; XIAO, X.; PENG, P.; XU, F.; SUN, R. Effect of [Emim]Ac pretreatment on the structure and enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse cellulose. **Carbohydrate Polymers**, 2013.
- BINOD, P., SINDHU, R., SINGHANIA, R. R., VIKRAM, S., DEVI, L., NAGALAKSHMI, S., KURIEN, N., SUKUMARAN, R. K., PANDEY, A. Bioethanol production from rice straw: An overview. **Bioresource Technology**, v.101, 2010, p. 4767-4774.
- BOMMARIUS, A.S.; KATONA, A.; CHEBEN, S.E.; PATEL, A.S.; RAGAUSKAS, A.J.; KNUDSON, K.; PU, Y. Cellulose kintecs as a function of cellulose pretreatment. **Metabolic Engineering**, v. 10, 2008, p. 370-381.
- BON, E. P. S., GIRÍO, F.; PEREIRA, N. J. Enzimas na produção de etanol. In:____. **Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicação e Mercado**. 1ª ed, Rio de Janeiro: Editora Interciencia, 2008, p. 506.
- BOYER, L. J.; VEGA, J. L.; KLASSON, K. T.; CLAUSEN, E. C. GADDY, J. L. The effects of furfural on ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* in batch culture. **Biomass Bioenergy**, v. 3, 1992, p. 41-48.
- BREUIL, C.; CHAN, M.; GILBERT, M.; SADDLER, J. N. Influence of β -glucosidase on the filter paper activity and hydrolysis of lignocellulosic substrates. **BioresourceTechnology**, v. 39, 1993, p. 139-142.
- BROWNELL, H. H. **Steam pretreatment of wood**. Progress report for the Project No. 04-53-12-402, Forintek Canada Co., Ottawa, Ontario, 1989.
- BUABAN, B., INOUE, H., YANO, S., TANAPONGPIPAT, S., RUANGLEK, V., CHAMPREDA, V., PICHYANGKURA, R., RENGPIPAT, S., EURWILAICHITR, L., Bioethanol production from ball milled bagasse using an on-site produced fungal

- enzyme cocktail and xylose-fermenting *Pichia stipitis*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 110, 2010, p.18-25.
- BURA, R.; CHANDRA, R.; SADDLER, J. Influence of xylan on the enzymatic hydrolysis of steam-pretreated corn stover and hybrid poplar. **Bioresource Technology**, v. 25, 2009, p. 314-322.
- CAMASSOLA, M.; DILLON, A. J. P. Biological pretreatment of sugar cane bagasse for the production of cellulases and xylanases by *Penicillium echinulatum*. **Industrial Crops and Products**. v. 29, 2009, p. 642-647.
- CAMPBELL, A. M.; PENFIELD, M. P.; GRISWOLD, R. M. **The experimental study of food**. 2nd Ed. Boston: Houghton Mifflin Company, 1979, p. 513.
- CANTARELLA, M.; CANTARELLA, L.; GALLIFUOCO, A.; ALFANI F. Comparison of different detoxification methods for steam-exploded poplar wood as a substrate for the bioproduction of ethanol in SHF e SSF. **Process Biochemistry**, v. 39, 2004, p. 1533-1542.
- CANTERI, M. H. G.; MORENO, L.; WOSIACKI, G.; SCHEER, A. G. Pectina: da matéria-prima ao produto final. **Polímeros**, v. 22, 2012, p. 149-157.
- CARA, C., RUIZ, E., BALLESTEROS, I., NEGRO, M. J., CASTRO, E. Enhanced enzymatic hydrolysis of olive tree wood by steam explosion and alkaline peroxide delignification. **Process Biochemistry**, v. 41, 2006, p. 423-429.
- CARA, C.; RUIZ, E.; OLIVE, J.M.; SÁEZ, F.; CASTRO, E. Conversion of alive tree biomass into fermentable sugars by dilute acid pretreatment and enzymatic saccharification. **Bioresource Technology**, v. 99, 2008, p. 1869-1876.
- CARASCHI, J. C.; CAMPANA FILHO, S. P.; CURVELO, A. A. Preparação e caracterização de polpas para dissolução obtidas a partir de bagaço de cana-de-açúcar. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, 1996, p. 27-29.
- CARDONA, C. A., QUINTERO, J. A., PAZ, I. C. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: Status and perspectives. **Bioresource Technology**, v. 101, 2010, p. 4754-4766.
- CARDONA, C. A., QUINTERO, J. A., PAZ, I. C., Production of bioethanol from sugarcane bagasse: Status and perspectives. **Bioresource Technology**, v. 101, 2010, p. 4754-4766.
- CARIOCA, J. O. B., ARORA, H. L. **Biomassa, fundamentos e aplicações tecnológicas**. São Paulo: Editora UFC, 1984, p. 180.
- CARRASCO, F. Thermo-mechano-chemical pretreatment of wood in a process development unit. **Wood Science and Technology**, v. 26, 1992, p. 413-428.

- CARVALHEIRO, F. DUARTE, L. C.; GÍRIO, F. M. Hemicellulose biorefineries: a review on biomass pretreatments. **Journal of Scientific and Industrial Research**. v. 67, 2008, p. 849-864.
- CARVALHO, M. L. **Estudo cinético da hidrólise enzimática de celulose de bagaço de cana-de-açúcar**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de São Carlos, 2011, p. 18-23.
- CASTRO, A. M.; PEREIRA JR., N. Produção, propriedade e aplicações de celulasas na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, 2010, p. 181-188.
- CASTRO, E.; CARA, C.; RUIZ, E.; OLIVA, J. M.; SÁEZ, F. Conversion of olive tree biomass into fermentable sugars by dilute acid pretreatment and enzymatic saccharification. **Bioresource Technology**. v. 99, 2008, p. 1869-1876.
- CHAN, M.; BREUIL, C.; SCHWALD, W.; SADLER, J.N. Biotechnol. **Journal of Applied Microbiology**, v. 31, 1989, p. 413-418.
- CHANDRA, R.P.; BURA, R.; MABEE, W.E.; BERLIN, A.; PAN, X.; SADDLER, J.N. Substrate pretreatment: the key to effective enzymatic hydrolysis of lignocellulosics. **Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology**, v. 108, 2007, p. 67-93.
- CHEN, C. L.; ROBERT, D. Characterization of lignin by ^1H NMR spectroscopy. **Methods Enzymology**, v.161, 1988, p.137-175.
- CHEN, W.; TU, Y.; SHEEN, H. Disruption of sugarcane bagasse lignocellulosic structure by means of dilute sulfuric acid pretreatment with microwave-assisted heating. **Applied Energy**, v. 88, 2011, p. 2726-2734.
- CHEN, W.-H., PEN, B.-L., YU, C.-T., HWANG, W.-S., Pretreatment efficiency and structural characterization of rice straw by an integrated process of dilute-acid and steam explosion for bioethanol production. **Bioresource Technology**, v. 102, 2011, p. 2916-2924.
- CHIARAMONTIA, D.; PRUSSI, M.; FERRERO, S.; ORIANI, L.; OTOONELLO, P.; TORRE, P.; CHERCHI, F. Review of pretreatment processes for lignocellulosic ethanol production, and development of an innovative method. **Biomass and Bioenergy**, v. 46, 2012, p. 25-35.
- CONDE-MEJÍA, C.; JIMÉNES-GUTIÉRREZ, A.; EL-HALWAGI, M. A comparison of pretreatment methods for bioethanol production from lignocellulosic materials. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 90, 2012, p. 189-202.
- CONVERSE, A. O. E WARE, W. On the reactivity of cellulosic substrates in enzymatic hydrolysis. **IEA/BIOFOR Workshop on Applications of Biotechnology in Bioenergy Systems**, 18 - 20 de Outubro, 1994, Ottawa, Canada.

- CONVERSE, A.O.; MATSUNO, R.; TANAKA, M.; TANIGUCHI, M. A model for enzymes adsorption and hydrolysis of microcrystalline cellulose with slow deactivation of the adsorbed enzyme. **Biotchnology and Bioengineering**, v. 32, 1998, p. 38-45.
- COSTA, D.A. **Caracterização de leveduras termotolerantes para produção de etanol celulósico**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Ouro Petro, 2011.
- CUNHA, C. M.; SILVA, F. T. Characterization of carbohydrates present in hydrolyzate obtained from sugar cane bagasse pretreated by explosion. In____. **6th Brazilian Symposium Chemistry Lignins and other Wood Components**, vol. VII, São Paulo, 2001. Proceeding..., p.221-226.
- D'ALMEIDA, M. L. O. **Composição química de materiais lignocelulósicos. Celulose e Papel** – Tecnologia de Fabricação da Pasta Celulósica, 2^a Ed., v. 1, São Paulo: Instituto de Pesquisas do Estado de São Paulo, 1988.
- DALE, M.C.; MOELHMAN, M. Enzymatic simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of biomass to ethanol in a pilot 1301 Multistage continuous reactor separator. **Ninth Biennial bioenergy conference**, Buffalo, New York, October 15-19, 2000.
- DATAR, R.; HUANG, J.; MANESSA, P.; MOHAGHEGHIA, S. C.; CHORNET, E. Hydrogen production from the fermentation of corn stover biomass pretreated with a steam-explosion process. **International Journal of Hydrogen Energy**. Disponível em <[http:// www.elsevier.com/locate/ijhydene](http://www.elsevier.com/locate/ijhydene)>, 2006.
- DAWSON, L; BOOPATHY, R. Cellulosic ethanol production from sugarcane bagasse without enzymatic saccharification. **Bioresources**, v. 3, 2008, p. 452-460.
- DEKKER, R. F. H.; WALLIS, A. F. A. Enzymic saccharification of sugarcane bagasse pretreated by autohydrolysis explosion. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 25, 1983, p. 3021-3048.
- DELGENES, J.P.; MOLETTA, R.; NAVARRO, J.M. Effects of lignocelluloses degradation products on ethanol fermentations of glucose and xylose by *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis*, *Pichia stipitis* and *Candida shehatae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 19, 1996, p. 220-225.
- DENCE, C. W.; LIN, S. Y. **Methods in Lignin Chemistry**. New York: Springer Verlag, 1992.
- DENCE, C.W.; REEVE, D.W., *Pulping Bleaching: Principles and Praticce*. Atlanta: **Tappi**. 1996.
- DESCHAMPS, F. C.; RAMOS, L. P.; FONTANA, J. D. Pretreatment of sugarcane bagasse for enhanced ruminal digestion. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 57/58, 1996, p. 171-182.

- EKLUND, R., GALBE, M., ZACCHI, G. The influence of SO₂ and H₂SO₄ impregnation of willow prior to steam pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 52, 1995, p. 225–229.
- EMMEL, A, MATHIAS, A. L.; WYPYCH, F.; RAMOS, L. P. Fractionation of *Eucalyptus grandis* chips by dilute acid-catalysed steam explosion. **Bioresource Technology**, v. 86, 2003, p. 105-115.
- EMMEL, A.; MATHIAS, A. L.; WYPYCH, F.; RAMOS, L. P. Fractionation of *Eucalyptus grandis* chips by dilute acid-catalysed steam explosion. **Bioresource Technology**, v. 86, 2003, p.105-115.
- ESTEGHLALIAN, A., HASHIMOTO, A.G., FENSKE, J.J., PENNER, M.H. Modeling and optimization of the dilute-sulfuric-acid pretreatment of corn stover, poplar and switchgrass. **Bioresource Technology**, v. 59, 1997, p. 129-136.
- EXCOFFIER, G.; TOUSSAINT, B.; VIGNON, M. R. Saccharification of steam-exploded poplar wood. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 38, 1991, p. 1308-1317.
- FAIX, O. Classification of ligninas from different botanical origins by FT-IR spectroscopy. **Holzforschung**, v. 45, 1991, p. 21-27.
- FAN, L. T.; GHARPURAY, M. M.; LEE, Y. H. **Cellulose hydrolysis**. New York: Springer-Verlag, 1987.
- FENGEL, D.; WEGENER G. **Wood: chemistry, ultrastructure, reactions**. Berlin: Walter de Gruyter, 1989.
- FERNANDES, D.M. **Estudos da estabilidade térmica de blendas de poli(álcoolvinílico)/lignina modificada**. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Maringá, 2005.
- FONSECA, B. G.; VIEIRA, E. R.; RODRIGUES, L. C.; MOUTTA, R. O.; NOGUEIRA, A. S.; HOU-RUI, Z.; FERRAZ, F. O.; BARATELLA, B. F.; SILVA, S. S. Biological detoxification of different hemicellulosic hydrolysates using *Issatchenkia occidentalis* CCTCC M206097 yeast. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 38, 2011, p. 199-207.
- FONTANA, J. D.; PASSOS, M.; BARON, M.; RAMOS, I. p. Cassava starch maltodextrinization/monomerization through thermo-pressurized aqueous phosphoric acid hydrolysis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 84/86, 2001, p. 1147-1161.
- FONTANA, J. D.; RAMOS, L. P.; KRIEGER, N. Physical Methods Applied to Biotechnology. In:____. **Methods of Biotechnology**, Doelle, H. (Honorary Theme Editor) and Mitchell, D. (co-editor), EOLSS (UNESCO) - Encyclopedia of Life Support Systems, CD-ROM Special Edition, Oxford, UK, 2004 ([http://: www.eolss.co.uk](http://www.eolss.co.uk)).

- FOREMAN, P. K.; BROWN, D.; DANKMEYER, L.; DEAN, R.; DIENER, S.; DUNN-COLEMAN, N.S.; GOEDEGEBUUR, F.; HOUFEK, T.D.; ENGLAND, G.J.; KELLEY, A.S. et al. Transcriptional regulation of biomass-degrading enzymes in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, 2003, p. 1988-1997.
- FUKUSHIMA, R.S.; HATFIELD, R.D. Extraction and isolation of lignin for utilization as a standard to determine lignin concentration using the acetyl bromide spectrophotometric method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, 2001, p. 3133-3139.
- GALBE, M. e ZACCHI, G. A. Review of the production of ethanol from softwood. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 59, 2002, p. 618-628.
- GÁMEZ, S.; GONZÁLEZ-CABRIALES, J. J.; RAMÍREZ, J. A.; GARROTE, G. Study of the hydrolysis of sugar cane bagasse using phosphoric acid. **Journal of Food Engineering**, v. 74, 2006, p. 78-88.
- GEDDES, C.C.; MULTINNIX, M. T.; NIEVES, I. U.; HOFFMAN, R. W.; YOMANO, L. P.; MILLER, E. N.; SHANMUGAM, K. T.; INGRAM, L. O. Simplified process for ethanol production from sugarcane bagasse using hydrolysate-resistant *Escherichia coli* strain MM160. **Bioresource Technology**, v. 102, 2011, p. 2702-2711.
- GEDDES, C.C.; PETERSON, J.J.; ZACCHI, G.; MULTINNIX, M.T.; SHANMUGAN, K.T.; INGRAM, L.O. Optimization the saccharification of sugar cane bagasse using dilute phosphoric acid followed by fungal cellulases. **Bioresource Technology**, v. 101, 2010, p.1851-1857.
- GLASSER, W.G.; WRIGHT, R. S. Steam-assisted biomass fractionation. II. Fractionation Behavior of various biomass resources. **Biomass and Bioenergy**, v. 14, 1997, p. 219-235.
- GOLDSTEIN, I. S. Composition of biomass. In____. Goldstein, I. S. Ed. **Organic Chemicals from biomass**, CRC Press, Boca Raton, 1981, p. 9-18.
- GONG, C. S., CAO, N. J., DU, J., TSAO, G. T. Ethanol Production from Renewable Resources. **Advances in Biochemical Engineering and biotechnology**, v. 65, 1999, p. 207-241.
- GRAF, A.; KOEHLER, T. **Oregon cellulose-ethanol study: an evaluation of the potential for ethanol production in Oregon using cellusebased feedstocks**. Salem, Oregon, USA: Oregon Dept of Energy, 2000, p. 96.
- GRAY, K. A.; ZHAO, L.; EMPTTOGE, M. Bioethanol. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 10, 2006, p. 141-146.

- GRUNO, M., VÄLJAMÄE, P., PETTERSSON, G., JOHASSON, G. Inhibition of the *Trichoderma reesei* cellulases by cellobiose is strongly dependent on the nature of the substrate. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 86, 2004, p. 503-511.
- GUERRA, A. A. **Biodegradação de Madeira por *Ceriporiopsis subvermispora*: Caracterização dos polímeros residuais**. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, 2002.
- GUIMARÃES, J. L.; FROLLINI, E.; SILVA, C. G.; WYPYCH, F.; SATYANARAYANA, K. G. Characterization of banana, sugarcane bagasse and sponge gourd fibers of Brazil. **Industrial Crops and Products**, v. 30, 2009, p. 404-415.
- HAHN-HAGERDAL, B.; GALBE, M.; GORWA-GRAUSLUND, M.F.; LIDÉN, G.; ZACCHI, G. Bio-ethanol – the fuel of tomorrow from the residues of today. **Trends in Biotechnology**, v. 24, 2011, p. 549-556.
- HAMELINCK, C.N.; van HOOIJDONK, G.; FAAIJ, A.P.C. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term. **Biomass Bioenergy**, v. 28, 2005, p. 384-410.
- HAMELINCK, C.N.; van HOOIJDONK, G.; FAAIJ, A.P.C. **Prospects for ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance as development progresses**. Scientific report – NWS-E-2003-55. Utrecht University, Utrecht, The Netherlands: Copernicus Institute, Department of Science, Technology and Society, 2003, p. 35.
- HARI, S. K.; REDDY, T. J.; CHOWDARY, G.V. Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulosic wastes to ethanol using a thermotolerant yeast. **Bioresource Technology**, v. 77, 2001, p. 193-196.
- HEILINHEIMO L. *Trichoderma reesei* cellulases in processing of cotton. Espoo 2002, VTT Publications 483, VTT Technical Research Centre of Finland, 2002.
- HENDRIKS, A.T.W.M.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v.100, 2009, p.10-18.
- HERNÁNDEZ, J. F. M.; MIDDENDORF, B.; GEHRKE, M.; BUDELMANN, H. Use of waste of the sugar industry as pazzolana in lime-pazzolana binders: study of the reition. **Cement and Concrete Research**, v. 28, 1998, p. 1525-1356.
- HERNÁNDEZ-SALAS, J.M.; VILLA-RAMÍREZ, M.S.; VELOZ-RENDÓN, J.S.; RIVERA-HERNÁNDEZ, K.N.; GONZÁLEZ-CÉSAR, R.A.; PLASCENCIA-ESPINOSA, M.A.; TREJO-ESTRADA, S.R. Comparative hydrolysis and fermentation of sugarcane and agave bagasse. **Bioresource Technology**, v. 100, 2009, p. 1238-1245.
- HIGUCHI, T. Degradative Pathways of Lignin Model Compounds. In____. HIGUTCHI, T. **Biosyntesis and biodegradation of Wood Components**. London: Academic Press Inc, 1985, p.557-577.

- HILDÉN, L.; JOHANSSON, G. Recent development on celluloses and carbohydrate-binding modules with cellulose affinity. **Biotechnol Lett**, v. 26, 2004, p.1683-1693.
- HISHIYAMA, S.; SUDO, K. Degradation mechanism of lignin by steam-explosion. **Mokuzai Gakkaishi**, v. 38, 1992, p.944-949.
- HOAREAU, W.; TRINDADE, B.; FROLLINI, E. Sugar cane bagasse and curaua lignins oxidized by chlorine dioxide and reacted with furfuryl alcohol: characterization and stability. **Polymer Degradation and Stability**, v. 86, 2004, p. 567-576.
- HODGE, D. B.; KARIM, M. N.; SCHELL, D.J. McMILLAN, J.D. Soluble and insoluble solids contributions to high-solids enzymatic hydrolysis of lignocelluloses. **Bioresource Technology**, v. 99, 2008, p. 8940-8948.
- HOLTZAPPLE, M.; COGNATA, M.; SHU, Y.; HENDRICKSON, C. Inhibition of *Trichoderma reesei* cellulase by sugars and solvents. **Biotechnology and Bioengineering**, v.36, 1990, p.275–287.
- HORN, S.J.; ESTEVEZ, M.M.; NIELSEN, H.K.; LINJORDET, R.; EIJSINK, V.G.H. Biogas production and saccharification of *Salix* pretreated at different steam explosion conditions. **Bioresource Technology**, v. 102, 2011, p. 7932-7936.
- HSU, T. C.; GUO, G. L.; CHEN, W. H.; HWANG, W. S. Effect of dilute acid pretreatment of rice straw on structural properties and enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 101, 2010, p. 4907-4913.
- HU, T. A. **Pretreatment of biomass**. In: ___. Handbook on Bioethanol: Production and Utilization. Taylor & Francis, Washington, 1996, USA.
- HUBBELL, C. A.; RAGAUŠKAS, A. J. Effect of acid-chlorite delignification on cellulose degree of polymerization. **Bioresource Technology**, v. 101, 2010, p. 7410-7415.
- IMAI, M. IKARI, K. SUZUKI, I. High-performance hydrolysis of cellulose using mixed cellulase species and ultrasonication pretreatment. **Biochemical Engineering Journal**, v. 17, 2004, p. 79-83.
- INGRAM, L. O., GEDDES, C. C., PETERSON, J. J., ROSLANDER, C. ZACCHI, G., MULLINNIX, M. T.; SHANMUGAM, K. T. Optimizing the saccharification of sugar cane bagasse using dilute phosphoric acid followed by fungal cellulases. **Bioresource Technology**, v. 101, 2010, p. 1851-1857.
- INOUE, H.; HIDENO, A.; TSUKAHARA, K. FUJIMOTO, S.; MINOWA, T.; INOUE, S.; ENDO, T.; SAWAYAMA, S. Wet disk milling pretreatment without sulfuric acid for enzymatic hydrolysis of Rice straw. **Bioresource Technology**, v. 100, 2009, p. 2706-2711.
- ISHII, T. Structure and functions of feruloylated polysaccharides. **Plant Science**, v. 127, 1997, p. 111-127.

- ISHOLA, M.M; JAHANDIDEH, A.; HAIDARIAN, B.; BRANDBERG, T.; TAHERZADEH, M. Simultaneous saccharification, filtration and fermentation (SSF): A novel method for bioethanol production from lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, v. 133, 2013, p. 68-73.
- JØRGENSEN, H.; MØRKEBERG, A.; KROGH, K. B.R.; OLSSON, L. Production of cellulases and hemicellulases by three *Penicillium* species: effect of substrate and evaluation of cellulase adsorption by capillary electrophoresis. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, 2005, p. 42-48.
- KAAR, W. E.; GUTIERREZ, C.V.; KINOSHITA, C. M. Steam explosion of sugarcane bagasse as a pretreatment for conversion to ethanol. **Biomass and Bioenergy**, v. 14, 1998, p. 277-287.
- KADAM, K. L.; RYDHOLM, E. C.; McMILLAN, J. D. Development and validation of a kinetic model for enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass. **Biotechnology**, v. 20, 2004, p. 698-705.
- KARIMI K.; EMTIAZI, G.; TAHERZADEH, M.J. Ethanol production from dilute-acid pretreated rice straw by simultaneous saccharification and fermentation with *Mucor indicus*, *Rhizopus oryzae*, and *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, 2006, p. 138-144.
- KIM, T.H.; LEE, Y.Y. Pretreatment and fractionation of corn stover by ammonia recycle percolation process. **Bioresource Technology**, v. 96, 2005, p. 2007-2013.
- KLOCK, U.; MUNIZ, G. I. B.; HERNANDEZ, J. A.; ANDRADE, A. S. **Química da Madeira**. Universidade Federal do Paraná, 3ª edição revisada. Curitiba, 2005, p. 26.
- KLYSOV, A. A. Trends in biochemistry and enzymology of cellulose degradation. **Biochemistry**, v. 29, 2000, p. 10577-10585.
- KOSHLAND, D. E. Stereochemistry and the mechanism of enzymatic reactions. **Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v. 28, 1953, p. 416-436.
- KUMAR, R.; MAGO, G.; BALAN, V.; WYMAN, C. E. Physical and chemical characterizations of corn stover and poplar solids resulting from leading pretreatment technologies. **Bioresource Technology**, v. 100, 2009, p. 3948-3962.
- LASER, M.; SCHULMAN, D.; ALLEN, S. G.; LICHWA, J.; ANTAL JR, M.; LYND, L. R. A Comparison of Liquid Hot Water and Steam Pretreatments of Sugar Cane Bagasse for Bioconversion to Ethanol. **Bioresource Technology**, v. 81, 2002, p. 33-44.
- LAUREANO-PEREZ, L.; TEYMOURI, F.; ALIZADEH, H.; DALE, B. E. Understanding factors that limit enzymatic hydrolysis of biomass. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 121/124, 2005, p. 1081-1099.

- LEE, J. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. **Journal of Biotechnology**, v.56, 1997, p.1-24.
- LI, X. M.; PAN, X. J. Hydrogels based on hemicellulose and lignin from lignocellulose biorefinery: a mini-review. **Bioenergy**, v. 4, 2010, p. 289-297.
- LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial**. Edgard Blucher, v.3, 2001.
- LINDER, M.; TEERI, T. T. The Role and Function of Cellulose Binding Domain. **Journal of Biotechnology**. v. 57, 1997, p. 15-28.
- LINE, J. The enzyme wars: Biofuels digest, 24 de fevereiro 2012. Disponível em: <<http://www.biofuelsdigest.com/bdigest/2012/02/24/the-enzyme-wars>>. Acesso: 02/03/2013.
- LIU, Z. L.; MA, M.; SONG, M. Evolutionarily engineered ethanologenic yeast detoxifies lignocellulosic biomass conversion inhibitors by reprogrammed pathways. **Molecular Genetics Genomics**, v. 282, 2009, p. 233-244.
- LIU, Z. L.; SLININGER, P. J.; DIEN, B. S.; BERHOW, M. A.; KURTZMAN, C. P.; GORSICH, S. W. Adaptive response of yeasts to furfural and 5-hydroxymethylfurfural and new chemical evidence for HMF conversion to 2,5-bis-hydroxymethylfuran. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 31, 2004, p. 345-352.
- LU, Y.; YANG, B.; GREGG, D.; MANSFIELD, S.; SADDLER, J. Cellulase adsorption and an evaluation of enzyme recycle during hydrolysis of steam-exploded softwood residues. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, V. 98, 2002, p. 642-654.
- LY, Y.; RUAN, R.; CHEN, P.I., LIU, Z.; PAN, X.; LIN, X. Enzymatic hydrolysis of corn Stover pretreated by combined dilute alkaline treatment and homogenization. **Trans ASAE**, v. 47, 2004, p. 821-825.
- LYND, L. R.; WEIMER, P.J.; ZYL, W.H.; PRETORIUS, I.S. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. **Microbiology Molecular Biology**, v. 66, 2002, p. 506-577.
- MA, F., YANG, N., XU, C., YU, H., WU, J., ZHANG, X., Combination of biological pretreatment with mild acid pretreatment for enzymatic hydrolysis and ethanol production from water hyacinth. **Bioresource Technology**, v. 101, 2010, p. 9600-9604.
- MACKIE, K. L.; BROWNELL, H. H.; WEST, K. L.; SADDLER, J. N. Effect of sulphur dioxide and sulphuric acid on steam explosion of aspenwood. **Journal of Wood Chemistry and Technology**, v. 5, 1985, p. 405-425.
- MAMERS, H.; YURITTA, J. P.; MENZ, D.J. **The siropulper- an explosive alternative for ninwood pulping**. In. __. TAPPI Pulping Conference, Atlanta, 1981, p. 261-268.

- MANSFIELD, S. H.; MOONEY, C.; SADDLER, J. N. Substrate and enzymatic characteristics that limit enzymatic hydrolysis. **Biotechnology**, v. 15, 1999, p. 804-816.
- MARABEZI, K. Estudo sistemático das reações envolvidas na determinação dos teores de lignina e holocelulose em amostras de bagaço e palha de cana-de-açúcar. **Dissertação de Mestrado**. Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2009.
- MARTÍN, C.; GALBE, M.; WAHLBOM, C.F.; HAHN-HÄGERDAL, B.; JÖNSSON, L.J. Ethanol production from enzymatic hydrolysates of sugarcane bagasse using recombinant xylose-utilising *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, 2002, p. 274-282.
- MARTÍN, C.; KLINKE, H. B.; THOMSEN, A. B. Wet oxidation as a pretreatment method for enhancing the enzymatic convertibility of sugarcane bagasse. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, 2007, p. 426-432.
- MARTÍN, C.; MARCET, M.; THOMSEN, A.B. Comparison between wet oxidation and steam explosion as pretreatment methods for enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse. **BioResources**, v. 3, 2008, p. 670-683.
- MATTOS, L. R.; SILVA, F. T. Steam explosion of sugar cane bagasse catalysed by H_3PO_4 : I. Effect of temperature, time and acid content on sugarcane bagasse solubilization. **6th Brazilian Symposium Chemistry Lignins and other Wood Components**, v. VII, 2001, p. 407-411.
- MCMILLAN, J. D. Pretreatment of lignocellulosic biomass. In: Himmel, M. E.; Baker, J. O.; Overend, R. P. (Eds.), **Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production**. Washington: American Chemical Society, 1994, p. 292-324.
- MEDVE, J.; KARLSSON, J.; LEE, D.; TJERNELD.; F. Hydrolysis of microcrystalline cellulose by cellobiohydrolase I and endoglucanase II from *Trichoderma reesei*: adsorption, sugar production pattern and synergism of the enzymes. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 50, 1998.
- MELO, E. B.; C., I. α e β -glucosidases como alvos moleculares para desenvolvimento de fármacos. **Química Nova**, v. 29, 2006, p. 840-843.
- MENON, V.; RAO, M. Trends in bioconversion of lignocellulose: biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. *Progress in Energy and Combustion Science*, v. 38, 2012, p. 522-550.
- MESA, L.; GONZALEZ, E.; ROMERO, I.; RUIZ, E.; CARA, C.; CASTRO, E. Comparison of process configurations for ethanol production from two-step pretreated sugarcane bagasse. **Chemical Engineering Journal**, v. 175, 2011, p. 185-191.

- MES-HARTREE, M., DALE, B. E. e CRAIG, W. K. Comparison of steam and ammonia pretreatment for enzymatic hydrolysis of cellulose. **Applied and Microbial Technology**, v. 29, 1988, p. 462-468.
- MESQUITA, A.L.S. A indústria de celulose e papel. **O Papel**, v. 51, 1990, p. 50.
- MICHALOWICZ, G., TOUSSAINT, B. E VIGNON, M. R. Ultrastructural changes in poplar cell wall during steam explosion treatment. **Holzforschung**, v. 45, 1991, p. 175-179.
- MILÉO, P. C.; MULINARI, D. R.; BAPTISTA, C. A. R. P.; ROCHA, G. J. M.; GONÇALVES, A. R. Mechanical behaviour of polyurethane from Castor oil reinforced sugarcane straw cellulose composites. *Procedia Engineering*, v. 10, 2011, p. 2068-2073.
- MONTANE, D.; FARRIOL, X.; SALVADO, J.; JOLLEZ, P.; CHORNET, E. Application of steam explosion to the fractionation and rapid vapor-phase alkaline pulping of wheat straw. **Biomass and Bioenergy**, v. 14, 1995, p. 261-276.
- MOONEY, C. A.; MANSFIELD, S. D.; TOUHY, M. G.; SADDLER, J. N. The effect of initial pore volume and lignin content on the enzymatic hydrolysis of softwoods. **Bioresource Technology**, v. 64, 1999, p. 113-119.
- MORAIS, S. A. L.; NASCIMENTO, E. A.; MELO, D. C. Análise da madeira de *Pinus oocarpa*, Parte I – Estudos dos constituintes macromoleculares e extrativos voláteis. **Revista Árvore**, v. 29, 2005, p. 461-470.
- MORJANOFF, P. J.; GRAY, P. P. Optimization of steam explosion as a method for increasing susceptibility of sugarcane bagasse to enzymic saccharification. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 20, 1987, p. 733-741.
- MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y.Y.; HOLTZAPPLE, M.; LADISH, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 96, 2005, p. 673-686.
- NASCIMENTO, R. A. A. **Caracterização da lignina de bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor: identificação dos componentes de degradação e reações envolvidas**. Tese de Doutorado, Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, 2007.
- NAVARRO, A. R. Effects of furfural on ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*: mathematical models. **Current Microbiology**, v. 29, 1994, p. 87-90.
- NEGRO, M.J. MANZANARES, P. OLIVA, J.M. BALLESTEROS, I. BALLESTEROS, M. Changes in various physical/chemical parameters of *Pinus pinaster* wood after steam explosion pretreatment. **Biomass and Bioenergy**, v. 25, 2003, p. 301-308.
- NGUYEN, T.A.D.; KIM, K.R.; HAN, S.J.; CHO, H.Y.; KIM, J.W.; PARK, S.M.; PARK, J.C.; SIM, S.J. Pretreatment of rice straw with ammonia and ionic liquid for lignocellulose conversion to fermentable sugars. **Bioresource Technology**, v. 101, 2010, p. 7432-

7438.

- NIDETZKY, B.; HAYN, M.; MACARRON, R.; STEINER, W. Synergism of *Trichoderma reesei* cellulases while degradating diferent celluloses. **Biotechnology**, v. 15, 1993, p. 71-76.
- NIEVES, I. U.; GEDDES, C. C.; MILLER, E. N.; MULLINNIX, M. T.; HOFFMAN, R. W.; FU, Z.; TONG, Z.; INGRAM, L. O. Effect of reduced sulfur compounds on the fermentation of phosphoric acid pretreated sugarcane bagasse by ethanologenic *Escherichia coli*. **Bioresource Technology**, v. 102, 2011, p. 5145–5152.
- NORDE, W., HAYNES, C.A. Reversibility and mechanism of protein adsorption. in: *Proteins at Interfaces. Fundamentals and Applications*. ACS 602, 1995.
- OGEDA, T. L., PETRI, D. F. S., Biomass enzymatic hydrolysis. **Química Nova**, v. 33, 2010, p.1549-1558.
- ÖHGREN, K.; BURA, R.; SADDLER, J.; ZACCHI, G. Effect of hemicellulose and lignin removal on enzymatic hydrolysis of steam pretreated corn stover. **Bioresource Technology**, v. 98, 2007, p. 2503-2510.
- ÖHGREN, K.; GALBE, M.; ZACCHI, G. Optimization of steam pretreatment of SO₂-impregnated corn stover for fuel ethanol production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 121/124, 2005, p. 1055-1067.
- OLIVEIRA, F. M. V.; PINHEIRO, I. O.; SOUTO-MAIOR, A. M.; GONÇALVES, A. R.; ROCHA, G. J. M. Industrial-scale steam explosion pretreatment of sugarcane straw for enzymatic hydrolysis of cellulose for production of second generation ethanol and value-added products, **Bioresource Technology**, v. 130, 2013, p. 168–173.
- OLSSON, L.; SOERENSEN, H. R.; DAM, B. P.; CHRISTENSEN, H.; KROGH, K. M.; MEYER, A. S. Separate and simultaneous enzymatic hydrolysis and fermentation of wheat hemicellulose with recombinant xylose utilizing *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 129/132, 2006, p. 117-129.
- OYEKOLA, O. O. The enzymology of sludge solubilisation under biosulphidogenic conditions: isolation, characterization and partial purification of endoglucanases. **Dissertação de Mestrado**, Rhodes University, Grahamstown, South Africa, 2004.
- PAKULA, A. N.; PENTTILAE M. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. **FEMS Microbiol**, v. 29, 2005, p. 710-739.
- PALMQVIST, E.; HAHN-HAGERDAL B.; Influence of furfural on anaerobic glycolytic kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* in bath culture. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 62, 1999, p. 447-454.
- PALMQVIST, E.; HAHN-HAGERDAL, B.; GALBE, M.; ZACCHI, G. The effect of water-soluble inhibitors from steam-pretreated spruce wood on enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 19, 1996, p. 470-476.

- PALONEN, H. Role of lignin in the enzymatic hydrolysis of lignocellulose. **VTT Biotechnology**, 2004, p. 62.
- PALONEN, H.; TJERNELD, F.; ZACCHI, G.; TENKANEN, M. Adsorption of *Trichoderma reesei* CBH I and EG II and their catalytic domains on steam pretreated *softwood* and isolated lignin. **Journal of Biotechnology**, v. 107, 2004, p. 65-72.
- PAN, X.; GILKES, N.; SADDLER, J.N. Effect of acetyl groups on enzymatic hydrolysis of cellulosic substrates. **Holzforschung**, v. 60, 2006, p. 398-401.
- PAN, X.; ZHANG, X. GREGG, D. J.; SADDLER, J. N. Enhanced enzymatic hydrolysis of steam-exploded Douglas fir wood by alkali-oxygen post-treatment. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 2004, p. 1103-1114.
- PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V.; Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: Sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 74, 2000, p. 69-80.
- PARAJÓ, J. C.; ALONSO, J. L.; SANTOS, V. Delignification and swelling of *Eucalyptus* wood ahead of enzymatic hydrolysis of the cellulosic fraction. **Process Biochemistry**, v. 30, 1995, p. 537-545.
- PARK, Y. C.; KIM, J. S. Comparison of various alkaline pretreatment methods of lignocellulosic biomass. **Energy**, v. 47, 2012, p. 31-35.
- PENNER, M.H.; LIAW, E.T. Kinetic consequences of high ratios of substrate to enzyme saccharification systems based on *Trichoderma reesei* cellulase. In: HIMMEL, M.E.; BAKER, J.O.; OVEREND, R.P. *Enzymatic of Biomass for Fuels Production*. **American Chemical Society**, Washington, DC, 1994, p. 363-371.
- PETERSSON, A.; ALMEIDA, J. R. M.; MODIG, T.; KARHUMAA, K.; HAHN-HAGERDAL, B.; GORWA-GRAUSLUND, M. F. LIDÉN, G. A 5-hydroxymethylfurfural reducing enzyme encoded by the *Saccharomyces cerevisiae* ADH6 gene conveys HMF tolerance. **Yeast**, v. 23, 2006, p. 455-464.
- PERISSOTTO, D.O. Caracterização da lignina residual em polpas *kraft* e *kraft* modificada. **Tese de Doutorado**, Universidade Federal do Paraná, 2005.
- PIETROBON, V. C. **Hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com ácido e álcali utilizando enzimas microbianas**. Dissertação de Mestrado. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2008, p. 66.
- PITARELO, A. P. Avaliação da susceptibilidade do bagaço e da palha de cana-de-açúcar à bioconversão via pré-tratamento a vapor e hidrólise enzimática. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal do Paraná, 2007.
- PITARELO, A. P.; SZCZERBOWSKI, D.; ZANDONÁ FILHO, A.; RAMOS, L. P.; NDIAYE, P. M. Efeito da catálise fosfórica sobre o pré-tratamento a vapor e hidrólise

- enzimática do bagaço de cana. **Dossiê de pesquisa: Fontes renováveis**. Copel, 2010, p.163-182.
- PITARELO, A.P.; SILVA, T. A.; PERALTA-ZAMORA, P.; RAMOS, L.P. Efeito do teor de umidade sobre o pré-tratamento a vapor e a hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar. **Química Nova**, v. 35, 2012, p. 1502-1509.
- POPA, V. I.; SPIRIDON, I. Hemicellulose: Structure and Properties. **Polysaccharides: Structural Diversity and Functional Versatility**. 2005, p. 475-489.
- QING, Q.; Yang, B.; Wyman, C. Xylooligomers are strong inhibitors of cellulose hydrolysis by enzymes. **Bioresource Technology**, v. 101, 2010, p. 9624–9630.
- QIU, Z.; AITA, G. M.; WALKER, M. S. Effect of ionic liquid pretreatment on the chemical composition, structure and enzymatic hydrolysis of energy cane bagasse. **Bioresource Technology**. v.117, 2012, p. 251-256.
- RAMOS, L. P. Determination of cellulose degree of polymerization using gel permeation and universal calibration. In:____. **7TH Brazilian Symposium on the Chemistry of Lignins and other Components**. Belo Horizonte, 2001. *Anais...* p. 17-24.
- RAMOS, L. P. The chemistry involved in the pretreatment of lignocellulosic materials. **Química Nova**, v. 26, 2003, p. 863-871.
- RAMOS, L. P.; BREUIL, C.; SADDLER, J. N. Comparison of steam pretreatment of eucalyptus, aspen and spruce wood chips and their enzymatic hydrolysis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.34/35, 1992, p.37-48.
- RAMOS, L. P.; BREUIL, C.; SADDLER, J. N. The use of enzyme recycle and the influence of sugar accumulation on cellulose hydrolysis by *Trichoderma* cellulases. **Enzyme and Microbial Technology**, v.15, 1993, p.19-25.
- RAMOS, L. P.; FONTANA, J. D. Enzymatic saccharification of cellulosic materials. In: **Methods in Biotechnology: Environmental Biology: Methods in Protocols**, Spencer, J. F. T., Spencer, A. L. R., eds.. London: Humana Press, 2004, p.221-235.
- RAMOS, L. P.; SADDLER, J. N. Bioconversion of wood residues: mechanisms involved in pretreating and hydrolyzing lignocellulosic materials. In:____. **Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production**, Himmel, M. E., Baker, J. O.; Overend, R. P., Eds., 1994. Washington: American Chemical Society, Symposium Series 566, p. 325-341.
- ROCHA, C. P. **Otimização da produção de enzimas por *Aspergillus niger* em fermentação em estado sólido**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Uberlândia, 2010, p. 136.
- ROCHA, G.J.M.; MARTIN,C.; SILVA, V.F.N.; GOMES, E.O.; GONÇALVES, A.R. Mass balance of pilot-scale pretreatment of sugarcane bagasse by steam explosion

- followed by alkaline delignification. **Bioresource Technology**, v. 111, 2012, p. 447–452.
- ROCHA., G.J.M.; MARTIN,C.; SOARES, I.B.; MAIOR, A.M.S.; BAUDEL, H.B.; ABREU, C.A.M. Dilute mixed-acid pretreatment of sugarcane bagasse for ethanol production. **Biomass and Bioenergy**. v. 35, 2011, p. 663-670.
- RODRIGUES, M.A.; PINTO, P.; BEZERRA, R.M.; DIAS, C.V.M.; CARDOSO, V.M.G. Effect of enzyme extracts isolated from white-rot fungi on chemical composition and in vitro digestibility of wheat straw. **Animal Feed Science and Technology**, v. 141, 2008, p. 326-338.
- ROMANI, A.; GARROTE, G.; ALONSO, J.L.; PARAJO, J.C. Bioethanol production from hydrothermally pretreated *Eucalyptus globulus* wood. **Bioresource Technology**, v. 101, 2010, p. 8706-8712.
- RUDOLF, A.; LIDÉN, G.; BAUDEL, H.; ZACCHI, G.; HAHN-HAGERDAL, B. Simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated bagasse using *Saccharomyces cerevisiae* TMB3400 and *Pichia stipitis* CBS6054. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 99, 2008, p. 783-790.
- RUIZ, E.; CARA, C.; MANZANARES, P.; BALLESTEROS, M.; CASTRO, E. Evaluation os steam explosion pre-treatment for enzymatic hydrolusis of sunflower stalks. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 42, 2008, p. 160-166.
- SAAD, M. B. W., OLIVEIRA, L. R. M., CÂNDIDO, R. G., QUINTANA, G., ROCHA, G. J. M., GONÇALVES, A. R., Preliminary studies on fungal treatment of sugarcane straw for organosolv pulping. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, 2008, p. 220-225.
- SALIBA, E. O. S., RODRIGUEZ, N. M., MORAIS, S. A. L., PILÓ-VELOSO, D., Ligninas - Métodos de obtenção e caracterização química. **Ciência Rural**, v. 31, 2001, p. 917-928.
- SANCHEZ, B.; BAUTISTA, J. Effects of furfural and 5-hydroxymethylfurfural on the fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* and biomass production from *Candida guilliermondii*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 10, 1988, p. 315-318.
- SÁNCHEZ, O.J.; CORDONA, C.A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. **Bioresource Technology**, v. 88, 2008, p. 5270-5295.
- SANTOS, J.R.; SOUTO-MAIOR, A.M.; GOUVEIA, E.R.; MARTÍN, C. Comparação entre processos em SHF e SSF de bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae*. **Química Nova**, v. 33, 2010, p. 904-908.
- SANTOS, J.R.A.; LUCENA, M.S.; GUSMÃO, N.B.; GOUVEIA, E.R. Optimization of etanol production by *Saccharomyces cerevisiae* UFPEDA 1238 in simultaneous

- saccharification and fermentation of delignified bagasse. **Industrial Crops and Products**, v.36, 2012, p.584-588.
- SASAKI, H.; OKUMURA, R.; ASAKAWA, A.; ASADA, C.; NAKAMURA, Y. Production of D-lactic acid from sugarcane bagasse using steam-explosion. **Journal of Physics: Conference Series**, v. 352, 2012, p. 1-10.
- SASSER, P.; MARTENSSON, C.; GALBE, M.; ZACCHI, G. Steam pretreatment of H₂SO₄-impregnated *Salix* for the production of bioethanol. **Bioresource Technology**, v. 99, 2008, p. 137-145.
- SCHEWCHENKO, S. M.; BEATSON, R. P.; SADDLER, J. N. The nature of lignin from steam explosion/enzymatic hydrolysis of softwood. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 77, 1999, p. 867-876.
- SCHILLING, J.S.; TEWALT, J.P.; DUNCAN, S.M. Synergy between pretreatment lignocellulose modifications and saccharification efficiency in two brown rot fungal systems. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 84, 2009, p. 465-475.
- SCHLITTER, L. A. F. S.; ANTUNES, A. M. S.; PEREIRA JR., N. Investigations on ethanol production from lignocellulosic biomass in Brazil. **Journal of Technology Management & Innovation**, v. 7, 2012.
- SEGAL, L.; CREELY, J. J.; MARTIN, A. E.; CONRAD, C. M. An empirical method for estimating the degree of crystallinity of native cellulose using the X-ray diffractometer. **Textil and Research Journal**, v. 29, 1959, p.786-794.
- SHALLOM, D.; SHOHAM, Y. Microbial hemicellulases. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, 2003, p. 219-228.
- SHEVCHENKO, S. M.; CHANG, K.; ROBINSON, J.; SADDLER, J. N. Optimization of monosaccharide recovery by post-hydrolysis of the water-soluble hemicellulose component after steam explosion of softwood chips. **Bioresource Technology**, v. 72, 2000, p. 207-211.
- SHODA, U. Y.; NAKAMOTO, A.; GOTO, M.; TOKUHAR, W.; NORITAKE, Y.; KATAHIRA, S.; ISHIDA, N.; NAKASHIMA, K.; OGINO, C.; KAMIYA, N. Short time ionic liquids pretreatment on lignocellulosic biomass to enhance enzymatic saccharification. **Bioresource Technology**, v. 103, 2012, p. 446-452.
- SILVA, A. S.; LEE, S. H.; ENDO, T.; BOM, E. P. S. Major improvement in the rate and yield of enzymatic saccharification of sugarcane bagasse via retreatment with ionic liquid 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate ([Emim] [Ac]). **Bioresource Technology**, v. 102, 2011, p. 10505-10509.
- SILVA, C. G.; GRELIER, S.; PICHAVANT, F.; FROLLINI, E. Adding value to lignins isolated from sugarcane bagasse and *Miscanthus*. **Industrial Crops and Products**, v. 42, 2013, p. 87-95.

- SILVA, F. T. **Obtenção de insumos químicos a partir do aproveitamento integral do bagaço de cana**. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, 1995, p. 106.
- SINGH, N. B.; SINGH, V. D.; RAI, S. Hydration of bagasse ash-blended Portland cement. **Cement and Concrete Research**, v. 30, 2000, p. 1485 -1488.
- SIQUEIRA, G.; VÁRNAI, A.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A. M. F. Enhancement of cellulose hydrolysis in sugarcane bagasse by the selective removal of lignin with sodium chloride. **Applied Energy**, v. 103, 2013, p. 399-402.
- SJÖSTRÖM, E. **Wood Chemistry Fundamentals and Applications**. 2nd Edition. San Diego: Academic Press Inc., 1992.
- SJÖSTRÖM, E.; WESTERMARK, U. Chemical Composition of wood and pulps: basic constituents and their distribution. In: SJÖSTRÖM, E.; ALÉN, R. **Analytical Methods in Wood Chemistry, Pulping and Papermaking**. Berlin: Springer-Verlag, 1999.
- SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C. SLUITER, J.; TEMPLETON, D. Determination of ash in biomass. Laboratory Analytical Procedure: Technical Report NREL/TP-510-42622. **National Renewable Energy Laboratory**, 2008.
- SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C. SLUITER, J.; TEMPLETON, D.; CROCKER, D. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. Laboratory Analytical Procedure: Technical Report NREL/TP-510-42618. **National Renewable Energy Laboratory**, 2008.
- SOARES, I.B.; TRAVASSOS, J.A.; BAUDEL, H.M.; BENACHOURA, M.; ABREU, C.A.M. Effects of washing, milling and loading enzymes on the enzymatic hydrolysis of a steam pretreated sugarcane bagasse. **Industrial Crops and Products**, v. 33, 2011, p. 670-675.
- SOCOL, P.; PITARELO, A.P.; FERREIRA-LEITÃO, V.; GOTTSCHANLK, L.M.F.; FERRARA, M. A.; BON, E.P.S.; MORAES, L.M.P.; ARAÚJO, J.A.; TORRES, F.A.G. Bioethanol from lignocelluloses: status and perspectives in Brazil. **Bioresource Technology**, v. 101, 2010, p. 4820-4825.
- SÖDERSTRÖM, J.; PILCHER, L.; GALBE, M.; ZACCHI, G. Two-step steam pretreatment of softwood by dilute H₂SO₄ impregnation for ethanol production. **Biomass and Bioenergy**, v. 24, 2003, p. 475-486.
- SÖDERSTRÖM, J.; PILCHER, L.; GALBE, M.; ZACCHI, G. Two-step steam pretreatment of softwood by dilute H₂SO₄ impregnation for ethanol production. **Biomass and Bioenergy**, v. 24, 2002, p. 475-486.
- SOUZA, A.; MORAES, M. G.; RIBEIRO, R. C. L. F. Gramíneas do cerrado: carboidratos não-estruturais e aspectos ecofisiológicos. **Acta Botanica Brasilica**, v. 19, 2005, p. 81-90.

- SUKUMARAN, R.K.; SINGHANIA, R.R.; MATHEW, G.M.; PANDEY. Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocelluloses saccharification for bio-ethanol production. **Renewable Energy**, v. 34, 2009, p. 421-424.
- SUN, R.; WANG, K, JIANG, J.; XU, F. Influence os eteaming explosion time on the physical-chemical properties of cellulose from *Lespedeza stalks* (*lespedera cryptobotrya*). **Bioresource Technology**. v. 100, v. 100, 2009, p. 5288-5294.
- SUN, Y. Enzymatic hydrolysis of rye straw and Bermudagrass for ethanol production. **Tese de doutorado**, Biological and Agricultural Engeneering, North Caroline State University, 2002.
- SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignicellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, v. 83, 2002, p. 1-11.
- SWATLOSKI, R. P.; SPEAR, S. K.; HOLBREYAND, J. D. ROGERS, R. D. Dissolution of cellulose with ionic liquids. **Journal of the American Chemical Society**, v. 124, 2002, p. 4974-4975.
- SZCZERBOWISKI, D. Pré-tratamento a vapor da palha de cana-de-açúcar e sacarificação enzimática para a produção de hidrolisados susceptíveis à fermentação alcoólica. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal do Paraná, 2011.
- TADESSE, H.; LUQUE, R. Advances on biomass pretreatment using ionic liquids: An overview. **Energy & Environmental Science**. v. 4, 2011, p. 3913-3929.
- TADESSE, H.; LUQUE, R. Advances on biomass pretreatment using ionic liquids: An overview. **Energy & Environmental Science**, v. 4, 2011, p. 3913-3929.
- TAHERZADEH, M. J.; GUSTAFSSON, L.; NIKLASSON, C.; LIDÉN; G. Physiological effects of 5-hydroxymethyrfurfural on *Saccharomyces cerevisia*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, 2000, p. 701-708.
- TAHERZADEH, M.J.; KARIMI, K. Acid-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. **BioResources**, v. 2, 2007, p. 472-499.
- TALEBNIA, F.; TAHERZADEHA, M. J. Utilization of carbohydrates contente of paper tube residuals ethanol production. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, 2012, p. 2149-2153.
- TAN, H.T.; LEE, K.T.; MOHAMED, A.R. Pretreatment of lignocellulosic palm biomass using a solvent-ionic liquid [BMIM]Cl for glucose recovery: An optimisation study using response surface methodology. **Carbohydrate Polymers**. v. 83, 2011, p. 1862-1868.
- TANAHASHI, M.; KARINA, M.; HIGUCHI, T. Degradation mechanism of lignin accompanyng steam explosion II. High-pressure steam treatment of guaiacylglycerol- β -guaiacyl ether. **Mokuzai Gakkaishi**, v. 36, 1990, p. 380-388.
- TANAKA, M.; NAKAMURA, H.; TANIGUSHI, M.; MORITA, T.; MATSUNO, R.; KAMIKUBO, T. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 23, 1986, p. 262-268.

TAPPI TEST METHODS. Atlanta: **TAPPI Press**, 1994.

TEERI T. T.; Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases. Trends in Biotechnology. v. 15, 1997, p. 160-167.

TEIXEIRA, L. C.; LINDEN, J. C.; SCHROEDER, H. A. Optimizing paraacetic acid pretreatment conditions for improved simultaneous saccharification and co-fermentation (SSCF) of sugar cane bagasse to ethanol fuel. **Renewable Energy**. v.16, 1999, p. 1070-1073.

TENGBORG, C.; GALBE, M.; ZACCHI, G. Reduced inhibition of enzymatic hydrolysis of steam-pretreated softwood. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 28, 2001, p. 835-844.

TENGBORG, C.; GALBE, M.; ZACCHI, G. Reduced inhibition of enzymatic hydrolysis of steam-pretreated softwood. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 28, 2001, p. 835-844.

TÍMAR-BALÁZSY, A.; EASTOP, D. Chemical Principles of Textile Conservation. **Butterworth Heinemann**, Oxford, UK: Butterworth-Heinemann, 1998.

TRINDADE, W. G.; HOAREAU, W.; RAZERA, I. A.; RUGGIERO, R.; FRONLLINI, E.; CASTELLAN, A. Phenolic thermoset matrix reinforced with sugar cane bagasse fibers: attempt to develop a new fiber surface chemical modification involving formation of quinones followed by reaction with furfuryl alcohol. **Macromolecular Materials and Engineering**, v. 289, 2004, p. 728-736.

TUCKER, M.P.; KIM, K.H.; NEWMAN, M.M.; NGUYEN, Q.A. Effects of temperature and moisture on dilute-acid steam explosion pretreatment of corn stover and cellulase enzyme digestibility. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 105, 2003, p. 165-178.

VALTASAARI, L., SAARELA, K., Determination of chain length distribution of cellulose by gel permeation chromatography using the tricarbanilate derivative. **Paperi ja Puu**, v. 57, p.5-10, 1975.

VAN DYK, J.S.; PLETSCHE, B.I. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes – Factors affecting enzymes, conversion and synergy. **Biotechnology Advances**, v. 30, 2012, p. 1458-1480.

VAN MARIS, A. J.; ABBOTT, D. A.; BELLISSIMI, E.; VAN DEN BRINK, J.; KUYPER, M.; LUTTIK, M. A.; WISSELINK, H. W.; SCHEFFERS, W. A.; VAN DIJKEN, J. P.; PRONK, J. T. Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: current status. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 90, 2006, p. 391-418.

- VARNAL, A.; SIIKA-AHO, M.; VIKARI, L. Restriction of the enzymatic hydrolysis of steam pretreated spruce by lignin and hemicellulose. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, 2010, p. 185-193.
- VASCONCELOS, S. M.; SANTOS, A. M. P.; ROCHA, G. J. M.; SOUTO-MAIOR, A. M. Diluted phosphoric acid pretreatment for production of fermentable sugars in a sugarcane-based biorefinery. **Bioresource Technology**, v. 135, 2013, p. 46–52.
- VÁSQUEZ, M.P.; DA SILVA, J. N. C.; DE SOUZA Jr., M.B.; PEREIRA JUNIOR, N. Enzymatic hydrolysis optimization to ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 137, 2007, p. 140-151.
- VORAGEN, G. J.; PILNIK, W.; THIBAUT, J. F.; AXELOS, M. A. V.; RENARD, C. M. G. “**Pectins**”. In __. Food polysaccharides and their applications, Stephen A. M. (ed.), Marcel Dekker Inc., New York, 1995.
- WANDERLEY, M. C. A.; MARTÍN, C.; ROCHA, G. J. M.; GOUVEIA, E. R. Increase in ethanol production from sugarcane bagasse based on combined pretreatments and fed-batch enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 128, 2013, p. 448-453.
- WATANABE, I.; NAKAMURA, T.; SHIMA, J.; Strategy for simultaneous saccharification and fermentation using a respiratory-deficient mutant of *Candida glabrata* for bioethanol production. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 110, 2010, p. 176-179.
- WENG, J.; LI, X.; BONAOWITZ, N.D.; CHAPPLE, C. Emerging strategies of lignin engineering and degradation for cellulosic biofuel production. **Current opinion in Biotechnology**, v. 19, 2008, p. 166-172.
- WILSON, B. D. Microbial diversity of cellulose hydrolysis. **Current opinion in Microbiology**, v. 4, 2011, p. 259-263.
- WINGREN, A.; GALBE, M.; ROSLANDER, C.; RUDOLF, A.; ZACCHI, G. Effect of reduction in yeast and enzyme concentrations in a simultaneous saccharification and fermentation - based bioethanol process - Technical and economic evaluation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 121, 2005, p. 485-499.
- WOOD, T.M.; SADDLER, J.N. Increasing the availability of cellulose in biomass materials. **Methods in Enzymology**, v. 160, 1988, p. 3-11.
- WYMAN, C. E. DALE, B. E. ELANDER, R. T. HOLTZAPPLE, M. LADISCH, M. R. LEE, Y.Y. Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. **Bioresource Technology**, v. 96, 2005, p. 1959-1966.

- XIAO, Z.; ZHANG, X.; GREGG, D.J.; SADDLER, J.N. Effects of sugar inhibition on cellulases and β -glucosidase during enzymatic hydrolysis of softwood substrates. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 113, 2004, p. 1115-1126.
- XIMENES, E.; KIMA, Y.; MOSIER, N.; DIEN, B.; LADISCH, M. Deactivation of cellulases by phenols. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 48, 2011, p. 54-60.
- XIMENES, E.; KIMA, Y.; MOSIER, N.; DIEN, B.; LADISCH, M. Inhibition of cellulases by phenols. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, 2010, p. 170-176.
- ZADIVAR, J.; MARTINEZ, A.; INGRAM, L.O. Effect of selected aldehydes on the growth and fermentation of ethanologenic *Escherichia coli*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 65, 1999, p. 24-33.
- ZAKIS, G. F. Functional Analysis of Lignins and Their Derivatives. Atlanta: **TAPPI PRESS**, 1994.
- ZHANG, Y. P.; DING, S.; MIELENZ, J. R.; CUI, J. Fractionating Recalcitrant Lignocellulose at Modest Reaction Conditions. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 97, 2007, p. 214-223.
- ZHANG, Y.H.P.; HIMMEL, M.E.; MIELENZ, J.R. Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. **Biotechnology Advances**, v. 24, 2006, p. 452-481.
- ZHANG, Y.H.P.; LYND, L.R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: monocomplexed cellulose systems. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 88, 2004, p. 797-824.
- ZHENG, M. LI, L.; LI, X.; YANG, X.; HE, Y. Enhancing anaerobic biogasification of corn stover through wet state NaOH pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 100, 2009, p. 5140-5145.
- ZHENG, Y.Z.; LIN, H.M.; TSAO, G.T. Pretreatment for cellulose hydrolysis by carbon dioxide explosion. **Biotechnology Progress**, v. 14, 1998, p. 890-896.
- ZHU, L.; O'DWYER, J. P.; CHANG, V. S.; GRANDA, C. B.; HOLTZAPPLE, M. T. Structural features affecting biomass enzymatic digestibility. **Bioresource Technology**, v. 99, 2008, p. 3817-3828.
- ZHU, S.; WU, Y.; CHEN, Q.; YU, Z.; WANG, C.; JIN, W.; DING, Y.; WU, G. Dissolution of cellulose with ionic liquids and its application: a mini-review. **Green Chemistry**, v. 8, 2006, p. 325-327.